



Kelly Veiga

Licenciada

Complexos de Escorpionato: Papel Biológico como Potenciais Agentes Anti-Tumor

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Marta Sofia Lopes Martins, Professora Doutora, ULHT

Júri:

Presidente: Doutor José Paulo Sampaio – FCT / UNL

Arguente: Doutor António Sebastião Rodrigues – FCM / UNL

Vogal: Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes – FCT / UNL



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro 2011

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Ciências da Vida

Kelly Veiga

Licenciada

**Complexos de Escorpionato: Papel Biológico como
Potenciais Agentes Anti-Tumor**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Marta Sofia Lopes Martins, Professora Doutora, ULHT

Monte de Caparica

2011

Complexos de Escorpionato: Papel Biológico como Potenciais Agentes Anti-Tumor.

Copyright Kelly Veiga, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

DEDICATÓRIA:

Ao Normando, Zulmira, Toni e Bruno,

"Il est libre Max avec ça famille y'en a même qui dises qui les ont vue voler!"

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado às pessoas e instituições que permitiram a concretização deste trabalho de investigação, no âmbito do meu mestrado em Genética Molecular e Biomedicina, que decorreu nos últimos meses. A todos deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Às Professoras, Doutora Alexandra Fernandes e Doutora Marta Martins obrigada.

À instituição de acolhimento, a Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias por ter permitido a realização de todo o trabalho científico.

Ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico e à aluna de Doutoramento Telma Silva, por ter cedido os compostos em estudo; ao *Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser* da Universidade Paul Verlaine coordenado pelo Doutor Patrick Chaimbault e ao aluno de Doutoramento David da Silva e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge coordenado pela Doutora Tânia Simões, por se terem disponibilizado na realização da identificação dos *spots* da proteómica e ainda ao *Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences* da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, coordenado pela Professora Doutora Cecília Rodrigues e ao Doutor Pedro Borralho por me ter orientado na concretização dos ensaios de MTS. Todos juntos permitiram a realização desta dissertação de mestrado e por isso deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA!

A todos os meus colegas de laboratório, Vanda, Ana Silva, Daniel, João, Luís, Marina, Ana Sousa, Helena, pelas constantes trocas de ideias, críticas e conselhos, por toda a entre-ajuda, espírito de equipa e amizade, dentro e fora do laboratório.

À Daniela Presa, amiga de sempre e para sempre. Obrigada por estares ao meu lado na altura certa e abrires-me os olhos para o Mundo.

À Joana Nabais, que reapareceu na minha vida numa altura muito complicada. Obrigada por seres como és! São poucas as almas como a tua.

À Leonor Silveira, que se tornou uma amiga do coração. Obrigada pelos teus abraços, conselhos, risotas e...enfim... Enjoy ☺ your Life!

Aos meus pais e ao meu irmão Wilson, pela constante paciência e compreensão sempre. Obrigada pelo vosso carinho e apoio incondicional.

Finalmente, ao meu namorado Emanuel, pela paciência interminável. Obrigada pelo teu amor, faz-me seguir dia após dia nesta luta constante e sem fim...

RESUMO

O cancro é uma doença genética com origem em células somáticas desordenadas à nível celular, que sofreram alterações permitindo escapar à vigilância do sistema imunitário. O tratamento por quimioterapia pretende controlar a disseminação da doença por metastização. Sendo assim, a investigação de compostos com acção citostática é de grande importância. Tendo sido comprovado a existência de complexos de escorpionato com essa actividade, pretendeu-se averiguar a acção citostática dos compostos TS199 e CoMeOH.

Para este fim, procedeu-se a avaliação da citotoxicidade e da morte celular dos complexos de escorpionato em estudo nas linhas tumorais HCT116 e HepG2, recorrendo aos ensaios de MTS e de coloração pelo método de Hoechst. Procedeu-se também ao estudo dos alvos e modos de acção na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizando a concentração mínima inibitória e a curva de crescimento, determinando a viabilidade celular e a actividade de espécies reactivas de oxigénio e estudando o seu proteoma. Os resultados obtidos para estes complexos foram comparados com os do antibiótico antracíclico, Doxorrubicina, uma vez que este composto tem acção citostática comprovada.

Os resultados obtidos em linhas HCT116 e HepG2 permitiram inferir que os complexos TS199 e CoMeOH possuem actividade citostática e estimulam a via de morte celular por apoptose. Conclui-se também que, os compostos em estudo inibem o crescimento celular normal da levedura possuindo uma concentração mínima inibitória semelhante. No que diz respeito as espécies reactivas de oxigénio, não se observou a sua indução nem na presença do composto TS199 e nem do composto CoMeOH. Ambos os complexos induzem a inibição do metabolismo energético da levedura, nomeadamente as vias do metabolismo glicolítico e do piruvato. Por último, de entre os dois complexos de escorpionato o composto CoMeOH parece ter maior capacidade inibitória do que o composto TS199, tanto nas linhas tumorais como na levedura.

Palavras-chave

Complexos de escorpionato; Acção citostática; HCT116; HepG2; *Saccharomyces cerevisiae*; Proteómica.

ABSTRACT

Cancer is a genetic disease which is a consequence of uncontrolled cell growth. Chemotherapy's goal is to control disease spreading by metastization. For that reason, it is extremely important to research new drugs with potential cytostatic activity. Since scorpionate compounds seem to have this feature the goal was to determine if TS199 and CoMeOH compounds shared this characteristic.

With that in view, these compounds were tested in HTC116 and HepG2 cell lines by MTS assay and Hoechst staining to evaluate citotoxicity and cellular death respectively. In *Saccharomyces cerevisiae*, targets and modes of action were studied by estimation of the minimal inhibitory concentration and growth curve, cell viability and reactive oxygen species formation assessment and finally by proteome analysis. The results were compared to Doxorubicin's which is a drug commonly used in chemotherapy.

The results obtain in cell lines lead to the conclusion that TS199 and CoMeOH compounds do have cytostatic activity and they stimulate cell death by apoptosis. In addition, these compounds inhibit yeast normal growth and do not lead to reactive oxygen species formation. TS199 and CoMeOH inhibit yeast metabolism through glicolysis and piruvate pathway inhibition. Lastly, CoMeOH seems to exert a stronger inhibitory effect on cell lines and on yeast than TS199.

Keywords

Scorpionate complexes; cytostatic activity; HCT116; HepG2; *Saccharomyces cerevisiae*; Proteomics.

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. Células saudáveis versus células cancerígenas	2
1.2. Tratamento de cancro	3
1.2.1. Quimioterapia	4
1.2.1.1. Doxorubicina: composto com acção anti-tumoral	6
1.2.2. Mecanismos celulares de resistência aos compostos	8
1.2.2.1. Alteração do transporte membranar	9
1.2.2.2. Alteração da expressão genética	10
1.2.2.3. Alteração nas moléculas alvo	11
1.2.2.4. Sobre-activação das vias de reparação do ácido desoxirribonucleico	11
1.2.2.5. Efeitos metabólicos	12
1.2.2.6. Factores de crescimento	13
1.3. Complexos de escorpionato	14
1.3.1. TS199	14
1.3.2. CoMeOH	15
1.4. Sistemas Modelo	15
1.4.1. Ciclo celular de um eucariota	15
1.4.2. Linhas celulares cancerígenas (modelo ex vivo)	16
1.4.2.1. Células de cancro colorectal humano	17
1.4.2.2. Células de carcinoma hepatocelular	19
1.4.3. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.4.3.1. Ciclo de vida da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	21
1.4.3.2. Crescimento microbiano	22
1.5. Proteómica	22
1.6. Objectivo do estudo	24
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Compostos em estudo	25
2.2. Linhas celulares HCT116 e HepG-2	25
2.2.1. Condições de cultura das linhas tumorais	25
2.2.2. Renovação de meio de cultura das linhas tumorais	26
2.2.3. Determinação da concentração celular viável das culturas	26
2.2.4. Adição dos compostos em estudo às culturas de células	27
2.2.5. Kit CellTiter 96 [®] AQ _{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	27
2.2.6. Marcação pelo método de Hoechst	28
2.3. Estirpe BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.3.1. Condições de cultura	29
2.3.2. Meio e condições de crescimento	29
2.3.3. Preparação do pré-inóculo	30
2.3.4. Determinação da concentração mínima inibitória de um composto	30
2.3.5. Crescimento na presença de um composto	32
2.3.6. Caracterização do crescimento celular	32
2.3.6.1. Medição da densidade óptica das culturas	32
2.3.6.2. Cálculo da taxa específica de crescimento	32

2.3.6.3.	Cálculo do tempo de duplicação	33
2.3.6.4.	Biomassa máxima	33
2.3.7.	Testes de viabilidade celular	33
2.3.8.	Avaliação das espécies reactivas de oxigénio	33
2.3.9.	Extracção proteica	34
2.3.10.	Precipitação proteica por TCA-DOC	35
2.3.11.	Quantificação de extracto	35
2.3.11.1.	Método de Lowry modificado	35
2.3.11.2.	Quantificação por SDS-Page	37
2.3.12.	Precipitação proteica pelo Kit 2-D Clean up	37
2.3.13.	Proteómica	38
2.3.13.1.	Primeira dimensão	38
2.3.13.2.	Segunda Dimensão	39
2.3.13.3.	Identificação de proteínas	40
2.3.13.4.	Análise dos géis	40
3.	Resultados e Discussão	41
3.1.	Linhas celulares	41
3.2.	Estirpe BY4741 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.2.1.	Determinação da concentração mínima inibitória	48
3.2.2.	Caracterização do crescimento celular	48
3.2.3.	Testes de viabilidade celular	50
3.2.4.	Espécies reactivas de oxigénio	52
3.2.5.	Análise proteómica	54
4.	Conclusões e Perspectivas Futuras	67
5.	Referências bibliográficas	71
6.	Referências electrónicas	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Diferenciação celular normal (A) e tumoral (B e C) a partir de células estaminais (adaptado de Alberts <i>et al.</i> , 2002).	3
Figura 1.2: Representa os locais de acção de alguns agentes citotóxicos (adaptado de Gerber, 2008). 5	
Figura 1.3: Fórmula estrutural do composto anti-tumoral Doxorrubicina (Toronto Research Chemicals Inc., http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=D558000 , acessado a 23/01/2011). ...	7
Figura 1.4: Mecanismos celulares de resistência aos compostos anti-tumorais (adaptado de Mendelsohn <i>et al.</i> , 2008).	9
Figura 1.5: Mecanismos de desintoxicação e de resistência aos compostos na célula efectuados pelos transportadores MDR na presença de xenobiótico e de compostos anti-tumorais. Estes protegem a célula de moléculas tóxicas endógenas ou exógenas que entram por difusão ou por captação activa. O mecanismo de protecção proporcionado pelos transportadores ABC por extrusão de substâncias tóxicas independentemente de serem metabolitos ou compostos pode tornar as células tumorais resistentes ao efeito tóxico de diversos agentes anti-tumorais (adaptado de Fletcher <i>et al.</i> , 2010).	10
Figura 1.6: Fórmula estrutural do composto $[\text{CuCl}_2\{\text{HOCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}]$ (conhecido por TS199) (Silva <i>et al.</i> , 2009).	14
Figura 1.7: Fórmula estrutural do composto $[\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}_2]$. $[\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}(\text{H}_2\text{O})_3]_2(\text{Cl})_6$ (designado CoMeOH).	15
Figura 1.8: Ciclo celular em organismos Eucariotas. Legenda: M - Mitose (adaptado de Prescott <i>et al.</i> , 2005).	16
Figura 1.9: Representa a progressão do cancro colorectal (adaptado de Grady e Carethers, 2008; http://www.humphath.com).	17
Figura 1.10: Representa a progressão do carcinoma hepatocelular (adaptado de Hussain <i>et al.</i> , 2002; http://www.hephelp.net ; http://pathweb.uchc.edu).	19
Figura 1.11: Ciclo de vida da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Legenda: a- <i>Mating-type a</i> , α - <i>Mating-type a</i> (adaptado de Herskowitz, 1988).	21
Figura 1.12: Esquema do crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> em sistema fechado. Estão representadas as quatro principais fases de um crescimento de levedura: latência, exponencial, estacionária e morte celular. (adaptado de Prescott <i>et al.</i> , 2005).	22
Figura 2.1: Exemplificação da elaboração de uma placa de 96 poços para execução das CMI.	31
Figura 3.1: Representação gráfica de viabilidade celular da linha tumoral HCT116 avaliada pelo ensaio de MTS na ausência e na presença do composto Doxorrubicina. Os resultados são expressos com as médias \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes. § $p < 0.05$ and * $p < 0.001$ comparando com o controlo negativo.	42
Figura 3.2: Representação gráfica de viabilidade celular de linhas tumorais HCT116 e HepG2 avaliadas pelo ensaio de MTS na ausência e na presença do composto TS199. Os resultados são	

expressos com as médias \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes. § $p < 0,05$ and * $p < 0,001$ comparando com o controlo negativo.	43
Figura 3.3: Representação gráfica de viabilidade celular de linhas tumorais HCT116 e HepG2 avaliadas pelo ensaio de MTS na ausência e na presença do composto CoMeOH. Os resultados são expressos com as médias \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes. * $p < 0,001$ comparando com o controlo negativo.	44
Figura 3.4: Células tumorais HCT116 marcadas pelo método de Hoechst na ausência e na presença dos compostos Doxorubicina, TS199 e CoMeOH. Observação feita por microscopia de fluorescência (400X). Resultados representativos de pelo menos três ensaios independentes.	46
Figura 3.5: Representação gráfica da avaliação de apoptose em células tumorais HCT116 pelo método de marcação de Hoechst. ¥ - $p < 0,01$ comparando com o controlo negativo.	47
Figura 3.6: Representação gráfica das curvas de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> estirpe BY4741 na ausência de composto (controlo negativo) e presença de Doxorubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH (compostos teste) a $\frac{1}{2}$ da CMI nas respectivas concentrações $25,86 \mu\text{M} \pm 0,01$; $545,41 \mu\text{M} \pm 0,01$; $505,45 \mu\text{M} \pm 0,01$	49
Figura 3.7: Representação gráfica das curvas de viabilidade celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> na ausência (controlo negativo) e presença de Doxorubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH (compostos teste) a $\frac{1}{2}$ da CMI ($25,86 \mu\text{M} \pm 0,01$; $545,41 \mu\text{M} \pm 0,01$; $505,45 \mu\text{M} \pm 0,01$, respectivamente) ao longo do tempo.	51
Figura 3.8: ROS em levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 na ausência de composto (controlo negativo), presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (0,03%, controlo positivo para ROS), Doxorubicina ($25,86 \mu\text{M}$), TS199 ($545,41 \mu\text{M}$) e CoMeOH ($505,45 \mu\text{M}$) crescida em meio MMB4. À esquerda estão as imagens tiradas em campo claro e à direita estão as imagens de fluorescência correspondentes. Observação feita por microscopia de fluorescência (400X).	53
Figura 3.9: Géis de proteómica para (A) controlo negativo da Doxorubicina (B) Doxorubicina (C) controlo negativo do TS199 (D) TS199 (E) controlo negativo do CoMeOH (F) CoMeOH obtidos por 2-DE, a partir de extractos proteicos de levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 crescida em MMB4 e recolhida durante a fase exponencial ($D_0 = 0,700 \pm 0,01$). Estão representadas as isoformas proteicas que foram identificadas por FMF/MALDI-FT-ICR-MS, para cada condição. As imagens (A) + (B); (C) + (D) e (E) + (F) representam conjuntos diferentes, nos quais estão representados a comparação de <i>spots</i> do composto com o respectivo controlo negativo.	55
Figura 3.10: Via da glicólise e do piruvato da levedura <i>S. cerevisiae</i> . Relação com os metabolismos de amido, sacarose, alanina, aspartato e glutamato e biossíntese de lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano (vermelho: enzimas de ponto de controlo da via da glicólise; verde: enzimas identificadas pela proteómica (adaptado de Pham e Wright, 2007).	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Concentração máxima inicial dos compostos testados para a determinação das CMI.....	30
Tabela 2.2: Concentração de ½ CMI para cada composto utilizado no crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i>	32
Tabela 2.3: Ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Lowry modificado.	36
Tabela 2.4: Programa de primeira dimensão executado na plataforma Ettan™ IPGPhor™3IEF (GE Healthcare UK Limited, Reino Unido) nas amostras tratadas neste estudo.	39
Tabela 3.1. CMI dos compostos testados.	48
Tabela 3.2: Caracterização do crescimento celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> quando crescida em meio MMB4 na ausência de composto (controlo negativo), na presença de Doxorubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH (compostos teste). Os valores da tabela são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.	49
Tabela 3.3: Avaliação da variação de expressão de cada isoforma proteica identificada por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nos diferentes conjuntos de géis utilizando o programa <i>Progenesis SameSpots</i>	56
Tabela 3.4: Proteínas identificadas por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nas diferentes condições testadas (controlo negativo, Doxorubicina ½ CMI, TS199 ½ CMI, CoMeOH ½ CMI) ordenadas pela localização na célula. Apresenta-se a descrição, os genes, os processos biológicos envolvidos e as funções moleculares de cada proteína (www.uniprot.org, acedido em Julho 2011; www.yeastgenome.org, acedido em Julho 2011).	58

LISTA DE SIMBOLOGIA E ABREVIATURA

μ_c	Taxa específica máxima de crescimento
2-DE	Electroforese em duas dimensões (do inglês: <i>Two Dimension Electrophoresis</i>)
5-FU	5-Fluorouracilo
a.a.	Aminoácido(s)
ABC	Transportador ABC (do inglês: <i>ATP-Binding Cassette</i>)
ADP	Adenosina difosfato
APC	Gene <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	Persulfato de amónia (do inglês: <i>Ammonium Persulfate</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
<i>BCL-2</i>	Gene <i>B cell lymphoma 2</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês: <i>Bovine Serum Albumine</i>)
<i>CDKN2A</i>	Gene <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
CHAPS	<i>3-[3-(cholomidopropyl)-dimethyl-ammonia]-1-proponesulphanate</i>
CHOP	Complexo composto por Ciclofosfamida, Vincristina e Prednison
CMI	Concentração mínima inibitória
<i>DCC</i>	Gene <i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i>
DCF	2',7' - diclorofluoresceína
dH ₂ O	Água destilada
DHFR	Reductase dihidrofolato (do inglês: <i>Dihydrofolate reductase</i>)
DMEM	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
DOC	Desoxicolato de sódio
DTT	Ditiotreitol
EGFR	Receptor do factor de crescimento epidérmico (do inglês: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
<i>ERCC1</i>	Gene <i>Excision Repair Cross-Complementing group 1</i>
FBS	Soro fetal bovino (do inglês: <i>Fetal bovine serum</i>)
f_d	Factor de diluição
FMF	Do inglês: <i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
HCT116	Cancro colorectal humano 116
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano 2
His	Histidina
IL-6	Interleucina-6
<i>K-RAS</i>	Gene <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Leu	Leucina
LHRH	Hormona libertadora de hormona luteinizante (do inglês: <i>Luteinising Hormone Releasing Hormone</i>)
MALDI-FT-ICR-MS	Do inglês: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
<i>MAT</i>	Do inglês: <i>mating type</i>

<i>MDR1/ABCB1</i>	Gene <i>Multidrug Resistance 1/Transportador ABCB1</i>
Met	Metionina
<i>MGMT</i>	Gene metil-guanina-metil-transferase
MMB4	Meio <i>Minimal Medium Broth</i> pH 4
MPTP	Canais de permeabilidade da mitocôndria (do inglês: <i>Mitochondrial Permeability Transition Pores</i>)
MRP1/ABCC1	Gene <i>Multidrug Resistance Protein 1/Transportador ABCC1</i>
MS	Espectrometria de massa (do inglês: <i>Mass Spectrometry</i>)
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MXR/ ABCG2	Gene <i>Mitoxantrone Resistance / Transportador ABCG2</i>
N	Número
NER	Reparação por excisão de nucleótidos (do inglês: <i>Nucleotide Excision Repair</i>)
OMS	Organização mundial de saúde
ORF	Grelha de leitura (do inglês: <i>Open Reading Frame</i>)
P	Fosfato inorgânico
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>)
P-gp	P-glicoproteína
PMS	Fenazina metosulfato (do inglês: <i>Phenazine Methosulfate</i>)
PMSF	Fluoreto de metilmetanosulfonil (do inglês: <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i>)
<i>Rb</i>	Gene retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
<i>SDS-Page</i>	Electroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide-gel electrophoresis</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
t _d	Tempo de duplicação
TEMED	N, N, N, N'-Tetrametiletilenodiamina
TGF β	Factor de crescimento beta
TGF-α	Factor de crescimento transformante alfa
<i>TP53</i>	Gene <i>Tumor protein p53</i>
UFC	Unidade formadores de colónias
Ura	Uracilo
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>).
YNB	Meio <i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	Meio <i>Yeast Peptone Dextrose</i>

LISTA DE UNIDADES

% p/v	Percentagem de peso / volume
% v/v	Percentagem de volume / volume
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Micrograma(s) por microlitro
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma(s) por mililitro
g	Grama(s): mg – Miligrama(s) (10^{-3}g); μg - Micrograma(s) (10^{-6}g)
g/L	Grama(s) por litro
h	Hora (s)
L	Litro(s): mL - Mililitro(s) (10^{-3}L); μL - Microlitro(s) (10^{-6}L)
Log	Logaritmo
M	Molar: mM - Milimolar (10^{-3}M); μM – Micromolar (10^{-6}M)
m	Metro(s): mm - Milímetro(s) (10^{-3}m); μm – Micrómetro(s) (10^{-6}m); nm – Nanómetro(s) (10^{-9}m)
mg/mL	Miligrama(s) por mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo
V	Volt(s)
W	Watt(s)

1. Introdução

A noção de que o cancro é uma doença recente causada pelo stress e o modo de vida moderno é contrariada pelas provas que apoiam a sua existência desde a Era dos dinossauros, há cerca de 125 milhões de anos, passando pelo Antigo Egipto, Antiga Grécia, Roma e Pérsia até aos dias de hoje (Teixeira e Casquinha, 1992). Actualmente, a luta contra o cancro constitui um dos problemas de Saúde Pública de maior complexidade e dimensão nos países desenvolvidos (Boyle e Levin, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a palavra cancro é o termo aplicado a um grande grupo de doenças que pode atingir qualquer parte do corpo de um indivíduo (<http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs297/en/>, acedido a 07/01/2011).

As células cancerígenas derivam de células somáticas a partir de eventos tais como, activação de oncogenes, inactivação de genes supressores de tumores ou em genes de *microRNA*, por exposição a agentes carcinogénicos físicos, químicos ou biológicos, conjuntamente com a predisposição genética de cada indivíduo (Alberts *et al.*, 2002; Croce, 2008; Klug e Cummings, 2002; <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs297/en/>, acedido a 07/01/2011).

Uma das características mais marcantes desta doença é a capacidade proliferativa ilimitada das células tumorais, que podem invadir locais adjacentes ao de origem (foco inicial) e desenvolverem-se noutros órgãos formando metástases. Estas últimas, constituem a principal causa de morte por cancro (Alberts *et al.*, 2002; Klug e Cummings, 2002; <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs297/en/>, acedido a 07/01/2011;).

Assim, considera-se que o cancro é uma doença genética com desordem a nível celular capaz de escapar à vigilância do sistema imunitário (Alberts *et al.*, 2002; Boyle e Levin, 2008; Klug e Cummings, 2002).

Os cancros são classificados de acordo com o tecido e o tipo celular a partir do qual têm origem. Os cancros com origem em células epiteliais são denominados de carcinomas enquanto os que têm origem em células do tecido conjuntivo ou muscular designam-se de sarcomas. Existem ainda outros tipos de cancros que não se incluem nestas duas categorias nomeadamente, leucemias, linfomas ou mielomas, que têm origem em células hematopoéticas. Os tipos de cancro com maior mortalidade são: pulmão, estômago, fígado, cólon e mama, sendo uns mais frequentes em homens e outros em mulheres. A idade é considerada um importante factor de risco no aparecimento da doença devido à acumulação de situações de risco tais como tabagismo, consumo de álcool, consumo insuficiente de frutos e legumes, infecções crónicas, e à perda de eficácia dos mecanismos de reparação celular ao longo da vida (Alberts *et al.*, 2002; Boyle e Levin, 2008; Teixeira e Casquinha, 1992; <http://www.cancer.gov/>, acedido a 20/01/2011).

Segundo *The International Agency for Research on Cancer*, em 2008 a nível mundial houve 12,4 milhões de casos incidentes (6 672 000 em homens e 5 779 000 em mulheres), 7,6 milhões de

mortes ($\approx 13\%$ de mortalidade) e 28,0 milhões de pessoas com cancro diagnosticado. Prevê-se cerca de 20,0 a 26,4 milhões de novos casos e 12,9 a 17,0 milhões de mortes para 2030, devido ao cancro (Boyle e Levin, 2008).

1.1. Células saudáveis *versus* células cancerígenas

Muitos cancros têm origem apenas numa célula ou num pequeno grupo de células que foram adquirindo diversas mutações em oncogenes, em genes supressores de tumores ou em genes de reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA), tornando as células capazes de proliferar continuamente. As células vão adquirindo alterações nas proteínas envolvidas na reparação do DNA, na sinalização celular, no ciclo de vida e morte celular programada (apoptose). Estas alterações podem conduzir a célula a um comportamento anormal, permitindo a sua manutenção no ciclo de divisão celular sem serem sinalizadas pelo sistema imunitário. A taxa de mutação das células, aumenta a probabilidade de progressão da doença (Alberts *et al.*, 2002; Boman e Wicha, 2008; Boyle e Levin, 2008; Roy, 2008; <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/>).

O aumento de células mutadas ocorre pelo aumento da taxa de divisão celular. Em tecidos normais, a renovação celular é feita continuamente (Figura 1.1.A) e tem por base uma série de mecanismos de regulação. A partir de uma célula estaminal obtêm-se duas células, uma célula-filha estaminal, que irá manter a população fundadora de células estaminais e outra célula que se diferenciara na célula do tecido alvo. O número de células mantém-se constante uma vez que a produção celular é compensada com perda celular, por apoptose. Se existir um desequilíbrio na divisão celular, a taxa de apoptose aumenta para eliminar o excedente de células geradas. Uma das características mais relevantes das células cancerígenas é a incapacidade de sofrerem apoptose (Alberts *et al.*, 2002).

Se a velocidade de produção de células estaminais e de diferenciação aumentar, a possibilidade de ocorrerem mutações aumenta também, no entanto, a compensação de génese celular e de destruição de células é mantida. Se uma célula estaminal anormal (Figura 1.1.B) passar despercebida às restrições celulares e iniciar um crescente aumento de células anormais, podem ocorrer alterações ao nível da produção das células que se irão diferenciar, fazendo com que as células estaminais proliferem de um modo descontrolado e consequentemente originar um tumor. Se ocorrerem alterações no processo de diferenciação e de paragem de divisão celular (Figura 1.1.C), a célula-filha poderá continuar a dividir-se indefinidamente sem sofrer apoptose, levando também à formação de um tumor (Alberts *et al.*, 2002).

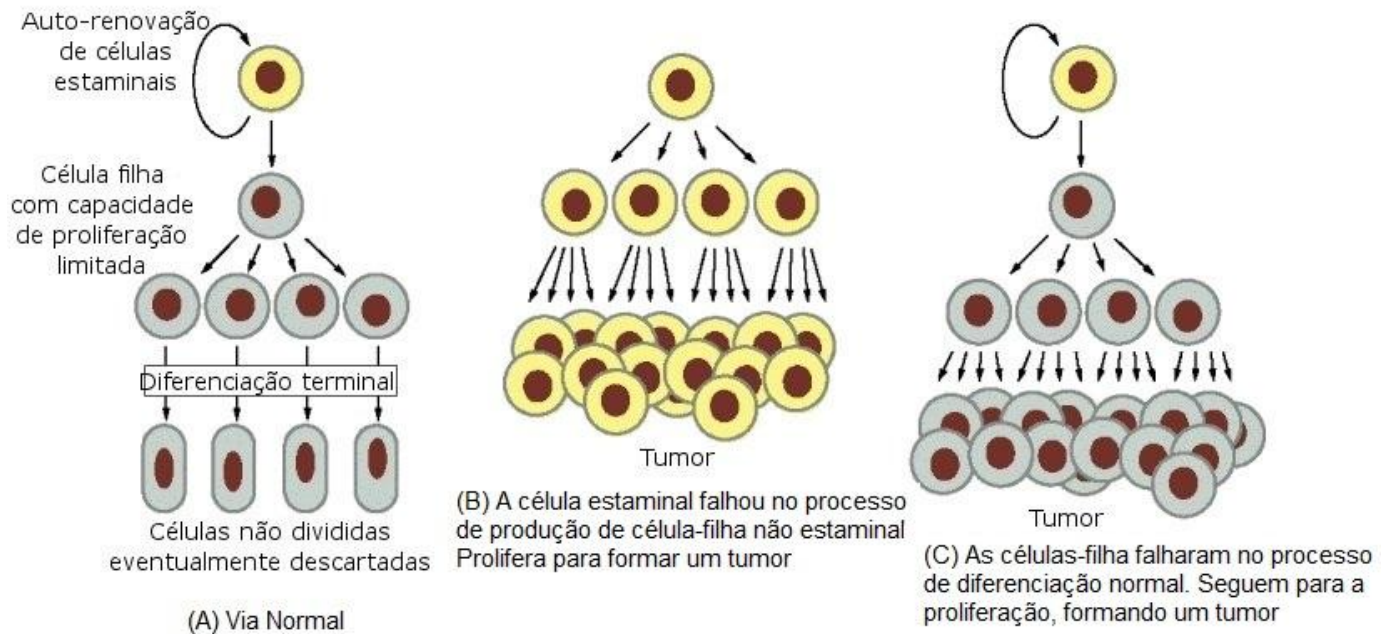


Figura 1.1: Diferenciação celular normal (A) e tumoral (B e C) a partir de células estaminais (adaptado de Alberts *et al.*, 2002).

1.2. Tratamento de cancro

O tratamento do cancro tem por objectivo curar, prolongar e/ou melhorar a qualidade de vida do doente, como tal, é de extrema importância fazer-se um diagnóstico exacto antes, durante e depois de efectuar o tratamento usando técnicas de captação de imagens (ecografia, endoscopia, radiografia) e técnicas de anatomia patológica (Boyle e Levin, 2008; Luqmani, 2005).

Os tratamentos dependem de uma variedade de factores, como por exemplo, as características patológicas específicas e moleculares do cancro, a sua localização, a extensão da doença e o estado de saúde do doente. O objectivo final do tratamento é destruir a maioria das células cancerígenas e minimizar os danos nas células saudáveis (Boyle e Levin, 2008; Luqmani, 2005).

Existem diferentes tipos de tratamento que podem ser aplicados isoladamente ou em sinergia. A cirurgia é uma intervenção frequente e considerada preventiva uma vez que é a primeira terapia aplicada, no caso de órgãos de risco (elevada probabilidade em desenvolver cancro) ou no caso de um cancro detectado precocemente. Este tratamento pode ser suficiente para curar o doente ou pelo menos reduzir substancialmente o risco de propagação do cancro (por metástases). A quimioterapia envolve o uso de compostos anti-tumorais que englobam um grande grupo de compostos citotóxicos que preferencialmente, mas não exclusivamente, atingem as células cancerígenas com elevada taxa de divisão celular. A radioterapia é usada em 50% dos casos dependendo do tipo de tumor e do desenvolvimento da doença. De um modo geral, esta terapia é aplicada em conjunto com a cirurgia ou a quimioterapia. A terapia endócrina é um tratamento mais específico e usualmente utilizado no cancro da mama e da próstata. Esta terapia previne a proliferação de células cancerígenas

antagonizando os sinais intracelulares estimulantes que controlam o crescimento de células que sobre-expressam os receptores das hormonas estrogénio, androgénio e testosterona. Neste tratamento os compostos usados são o Tamoxifeno (antagonista da hormona estrogénio), Arimedex (reduz a produção de estrogénio), Flutamida (antagonista da hormona androgénio) e hormona libertadora de hormona luteinizante (LHRH do inglês: *Luteinising Hormone Releasing Hormone*) (agonista utilizado para prevenir a libertação da LHRH e reduzir a testosterona privando as células cancerígenas do cancro da próstata de androgénio). Outro tratamento possível é a terapia biológica que se baseia na resposta do sistema imunitário, permitindo a sua auto-defesa minimizando os danos em células saudáveis. Nesta terapia são utilizados modificadores de respostas biológicas que permitem a modulação ilícita de uma resposta imune contra células cancerígenas. Um tipo de terapia biológica é a terapia direccionada ou terapia alvo que explora a sobre-expressão de proteínas específicas em células cancerígenas de forma a atingir o desenvolvimento e crescimento das células alvo, como por exemplo os anticorpos monoclonais. Outra opção é a utilização de inibidores metabólicos que têm como alvo proteínas específicas e vias metabólicas que podem envolver a regulação do ciclo celular. (Boyle e Levin, 2008; Gerber, 2008; Infarmed, 2010; Luqmani, 2005; <http://www.cancer.gov/>, acedido a 26/01/2011; <http://www.colorectal-cancer.ca/en/>, acedido a 27/01/2011)

1.2.1. Quimioterapia

A quimioterapia consiste na injeção ou administração oral de fármacos com acção anti-tumoral. Embora esta seja frequentemente utilizada para tumores primários, a sua principal aplicação é no controlo da disseminação da doença por metastização (Luqmani, 2005; Roy, 2008; Teixeira e Casquinha, 1992; <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/>, acedido a 07/02/2011).

Como mencionado anteriormente, as células cancerígenas possuem divisão celular descontrolada. Esta característica torna-as susceptíveis a um largo espectro de compostos anti-tumorais que têm como alvo moléculas biológicas envolvidas no ciclo celular. Uma desvantagem da aplicação de compostos anti-tumorais é que estes atingem também as células saudáveis com divisão activa, em condições normais, como por exemplo, as células da medula óssea e do epitélio intestinal, o que pode resultar em efeitos locais indesejados (Alberts *et al.*, 2002; Luqmani, 2005).

Devido à inespecificidade deste tratamento, o procedimento é extremamente tóxico para os doentes e pode não ser tolerado durante um longo período (Boyle e Levin, 2008).

Os compostos anti-tumorais utilizados na quimioterapia são extraídos de plantas ou sintetizados quimicamente e podem ser divididos em três grupos principais, consoante o seu modo e local de acção, nomeadamente inibidores do fuso mitótico, antimetabólitos e agentes genotóxicos (Figura 1.2).

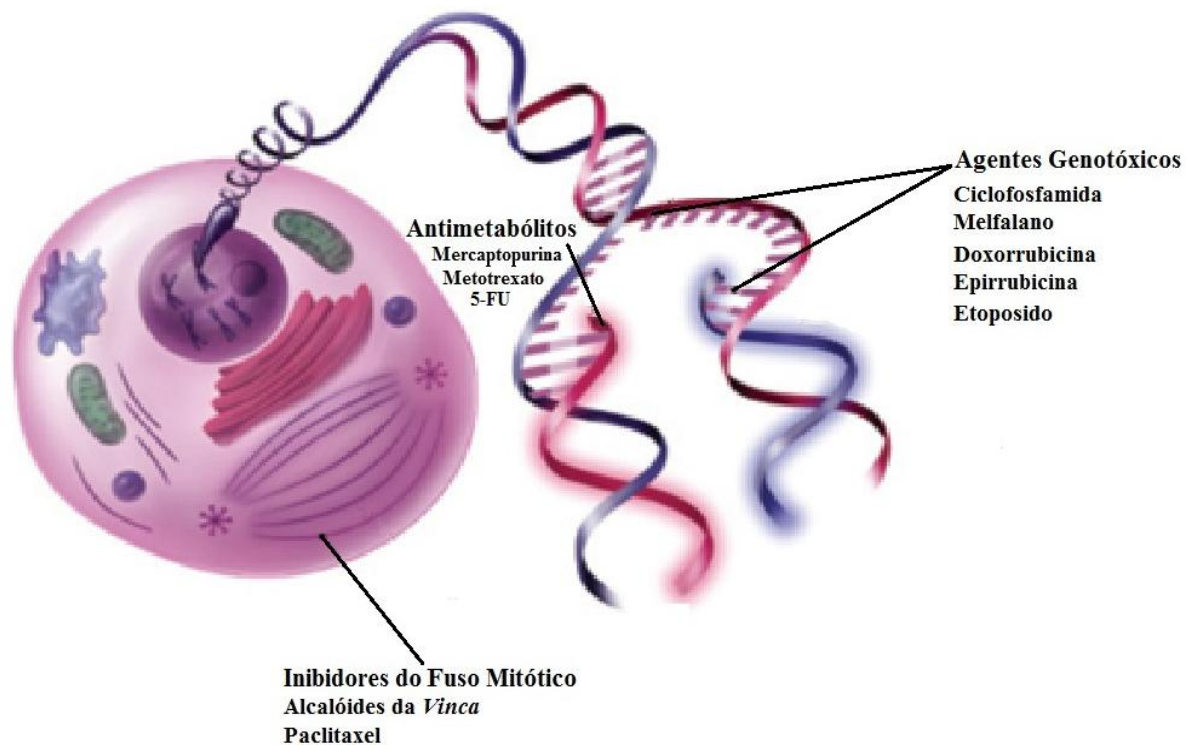


Figura 1.2: Representa os locais de acção de alguns agentes citotóxicos (adaptado de Gerber, 2008).

Os compostos inibidores do fuso mitótico interferem com o processo de mitose do ciclo celular, afectando a formação e função do fuso de microtúbulos requeridos no alinhamento dos cromossomas. Estes compostos impedem a polimerização de monómeros de tubulina impossibilitando a progressão do processo celular, desencadeando-se o processo de apoptose nas células. Estes compostos também podem afectar as células saudáveis, no entanto com menor incidência do que as células cancerígenas, devido à menor taxa de divisão celular das primeiras. Os compostos mais usuais deste grupo são alcalóides da *Vinca* derivados de plantas (Vinblastina, Vincristina e Vindesina), Paclitaxel e Docetaxel. Estes compostos são utilizados no tratamento de leucemias agudas, linfomas, cancro do pulmão, do ovário e da mama (Boyle e Levin, 2008; Infarmed, 2010; Luqmani, 2005).

Os compostos antimetabólitos são agentes metabólicos da fase S do ciclo celular e assemelham-se estruturalmente a compostos endógenos. Desta forma, impedem o processamento de nutrientes indispensáveis para o desenvolvimento celular. Estes compostos de um modo geral, são antagonistas de folatos, pirimidinas e purinas. Os antagonistas de folato são inibidores da reductase dihidrofolato (DHFR, do inglês: *Dihydrofolate reductase*), enzima envolvida no metabolismo de nucleótidos. Os folatos são co-enzimas requeridas na metilação e necessárias na formação de purinas e timidilatos. Por exemplo, o composto Metotrexato, inibidor da enzima DHFR, após a sua entrada na célula através de transportadores de baixo pH ou de transportadores folato reduzidos ou do ácido fólico, impede a redução da DHFR para tetrahydrofolato (co-factor envolvido na transferência do grupo metil). Um exemplo prático da acção deste composto é a inibição da síntese de timina, componente necessário à síntese da cadeia de DNA. O composto Metotrexato é utilizado para tratar

uma variedade de cancros como a leucemia linfocítica aguda, linfoma de grandes células, linfoma de primeira qualidade, coriocarcinoma e cancro da mama, bexiga, cabeça, pescoço e ossos, assim como muitas doenças inflamatórias. Os antagonistas pirimídicos mais comumente utilizados na terapia de cancro são o 5-Fluorouracilo (5-FU), Gemcitabina e Arabinosilcitosina. O composto 5-FU é metabolizado pelas células cancerígenas sobre a forma 5-fluorodesoxiuridina monofosfato que inibe a timidilatosintetase bloqueando a formação de nucleótidos pirimídicos na via de síntese do DNA. Os compostos Gemcitabina e Arabinosilcitosina esgotam as reservas intracelulares da desoxicitidina (citosina ligada a uma desoxirribose) provocando a terminação prematura do DNA recém-sintetizado. São extensamente usados no tratamento de cancro da mama, gastrointestinal, do pulmão e do pâncreas. Por fim, os antagonistas de purinas inibem a síntese de adenina e guanina. Os principais exemplos são o Aciclovir, o 6-Mercaptopurina e o 6-Tioguanina, usados para o tratamento de doenças hematológicas como por exemplo leucemias linfocíticas ou mielóides agudas, linfoblásticas e mielomonocíticas (Boyle e Levin, 2008; Infarmed, 2010; Luqmani, 2005; Mendelsohn *et al.*, 2008; Sousa, 2010; Teixeira e Casquinha, 1992; <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/>).

Os agentes genotóxicos são compostos que se ligam quer à molécula de DNA quer a enzimas envolvidas na sua replicação, danificando directa ou indirectamente o DNA, levando à indução de apoptose. Estes compostos podem ser agentes alquilantes, intercalantes e inibidores enzimáticos. Os agentes alquilantes são compostos que modificam as bases do DNA por alquilação, interferindo na replicação e transcrição, levando à ocorrência de mutações. A ligação cruzada (*cross-linking*) destes compostos ao DNA impede a separação da cadeia para os processos de síntese ou transcrição. Exemplos de compostos com características alquilantes são: Cisplatina, Carboplatina, Oxaliplatina, Mitomicina C, Ciclofosfamida, Melfalano, e Temozolomida. Os agentes intercalantes ligam-se à hélice do DNA, interferindo com a actividade da polimerase durante a replicação e transcrição. Exemplos de compostos com esta actividade são a Doxorrubicina (inibidora da Topoisomerase II) e Epirubicina. Os inibidores enzimáticos bloqueiam a replicação do DNA inibindo enzimas, tais como as topoisomerasas. Nestes casos, as células respondem à inibição seguindo a via de apoptose celular. As propriedades mutagénicas destes compostos tornam-nos também carcinogénicos, portanto o seu uso implica um risco adicional de desenvolvimento de cancros secundários, tais como leucemias. Exemplos destes compostos são o Etoposido (inibidor da Topoisomerase II), Topotecano e Irinotecano (ambos inibidores da Topoisomerase I) (Boyle e Levin, 2008; Luqmani, 2005; Sousa, 2010; <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/>).

1.2.1.1. Doxorrubicina: composto com acção anti-tumoral

O composto Doxorrubicina foi isolado da bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesius* e é conhecido por ser um antibiótico antracíclico. Tem por fórmula molecular $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$, massa molecular de $579,98 \text{ g.mol}^{-1}$ e apresenta-se visualmente com uma cor vermelha. Estruturalmente, (Figura 1.3) é composto por uma porção glicídica e outra não glicídica. A parte glicídica designa-se de

daunosamina e é constituída por um trideoxi-fucosil amino-substituído. A aglicona (parte não glicídica) denomina-se por doxorrubicinona, anel tetracíclico composto por quinona-hidroquinona e uma pequena cadeia lateral com um grupo carbonil no carbono 13 (C-13). (Infarmed, 2010; Salvatorelli *et al.*, 2009; <http://www.cancer.gov/drugdictionary/>, acessado a 26/01/2011; <http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=D558000>, acessado a 23/01/2011).

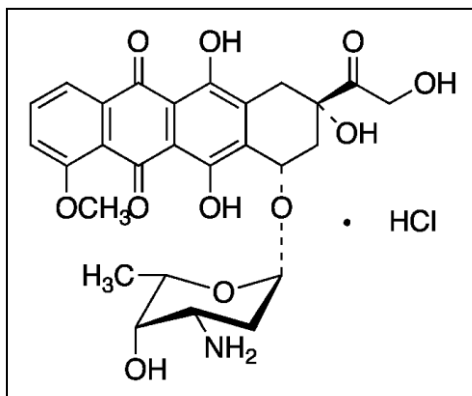


Figura 1.3: Fórmula estrutural do composto anti-tumoral Doxorrubicina (Toronto Research Chemicals Inc., <http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=D558000>, acessado a 23/01/2011).

Este agente anti-neoplásico intercalante é o mais usado desde os anos 60, para tratar vários tipos de cancros sólidos e doenças hematológicas, tais como cancro da mama, da bexiga, do endométrio, da tiróide, do pulmão, dos ovários, do estômago e ainda sarcoma osteogénico e leucemias mieloblástica e linfoblástica (Doroshov, 2001; Hammer *et al.*, 2009; Infarmed, 2010; Li *et al.*, 2007; Yokochi e Robertson, 2004).

A Doxorrubicina, pode em combinação com outros compostos, como a Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisona, formando o conjunto designado de CHOP, ser utilizada em tratamentos de linfomas de cães (Beaver *et al.*, 2010; Infarmed, 2010).

Apesar da sua frequente utilização clínica, os mecanismos de acção da Doxorrubicina ainda não são perfeitamente entendidos, sabendo-se no entanto que possui capacidade mutagénica (Doroshov, 2001; Hammer *et al.*, 2009).

Os efeitos citotóxicos da Doxorrubicina mais conhecidos são: a intercalação directa no DNA com formação de aductos (DNA-compostos) e alteração da síntese de ácido ribonucleico (RNA); inibição da topoisomerase II resultando na inibição da quebra da cadeia dupla de DNA; produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês: *Reactive Oxygen Species*); peroxidação lipídica; bem como ligação à membrana lipídica com alteração da estrutura e função da membrana (Beaver *et al.*, 2010; Benchekroun *et al.*, 1993; Doroshov, 2001; Hammer *et al.*, 2009; Infarmed, 2010; Yokochi e Robertson, 2004).

Considera-se ainda, que a Doxorrubicina interfere nas vias de apoptose e de sobrevivência da célula dada a sua acção citotóxica. A sua interferência na apoptose envolve a modulação de estruturas

mitocondriais que levam à disfunção das mitocôndrias, como a perda do citocromo *c* e abertura dos canais de permeabilidade da mitocôndria (MPTP do inglês: *Mitochondrial Permeability Transition Pores*) (Green e Leeuwenburgh, 2002; Hammer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007).

Os locais de acção da Doxorrubicina são principalmente no núcleo, no entanto pode ser detectada na mitocôndria, na membrana plasmática em quantidades apreciáveis, microssomas e no citoplasma em pequenas quantidades. Foi demonstrado que a Doxorrubicina pode acumular-se nos lisossomas interferindo com proteínas lisossomais, modificando a sua morfologia e a actividade enzimática (Hammer *et al.*, 2009).

Um dos mecanismos de resistência das células cancerígenas a este composto é através da expressão do gene *Multidrug Resistance 1/ Transportador ABCB1 (MDR1/ABCB1)* que codifica para a proteína fosforilada e glicosilada denominada por P-glicoproteína (P-gp) presente na membrana celular. Esta proteína faz a extrusão de compostos hidrofóbicos sem carga para o exterior da célula, conferindo uma resistência intrínseca às células (Litman *et al.*, 2000; Mellor e Callaghan, 2011; Mendelsohn *et al.*, 2008; Seydel e Wiese, 2002).

Devido aos efeitos cardiotoxícos que induz nos doentes, a Doxorrubicina é utilizada em tratamentos de curta duração, podendo levar ao aparecimento de cardiomiopatias ou insuficiência cardíaca congestiva (Dolci *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Infarmed, 2010; Jurcut *et al.*, 2008; Kunisada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007; Salvatorelli *et al.*, 2009; Yokochi e Robertson, 2004; Westmoreland *et al.*, 2009).

1.2.2. Mecanismos celulares de resistência aos compostos

A terapia de cancro efectuada por quimioterapia, é a base do tratamento de cancro disseminado e quando administrada como adjuvante, oferece uma vantagem de sobrevivência em doentes tratados por radioterapia ou cirurgia, uma vez que elimina tumores secundários não detectados. No entanto, a resposta dos tumores varia e por vezes fracassa devido à aquisição de um mecanismo de resistência aos compostos anti-tumorais utilizados. Esta resistência é detectada pelo aumento de massa tumoral ou nova manifestação após remissão do cancro (Hong *et al.*, 2010; Mendelsohn *et al.*, 2008; <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/>).

Geralmente, as células resistentes preservam sensibilidade a compostos de diferentes classes com mecanismos citotóxicos de acção alternativa. Assim, quando uma célula se torna resistente a um agente alquilante, normalmente mantém-se sensível a outro tipo de agente (p.ex: antracíclico) (Hong *et al.*, 2010).

Existem várias hipóteses que explicam os fenómenos de resistência aos compostos pelas células cancerígenas. Estas incluem alterações no transporte de compostos através da membrana plasmática, alteração da expressão genética, sobreactivação das vias de reparação do DNA, alteração nas moléculas alvo, efeitos metabólicos e factores de crescimento

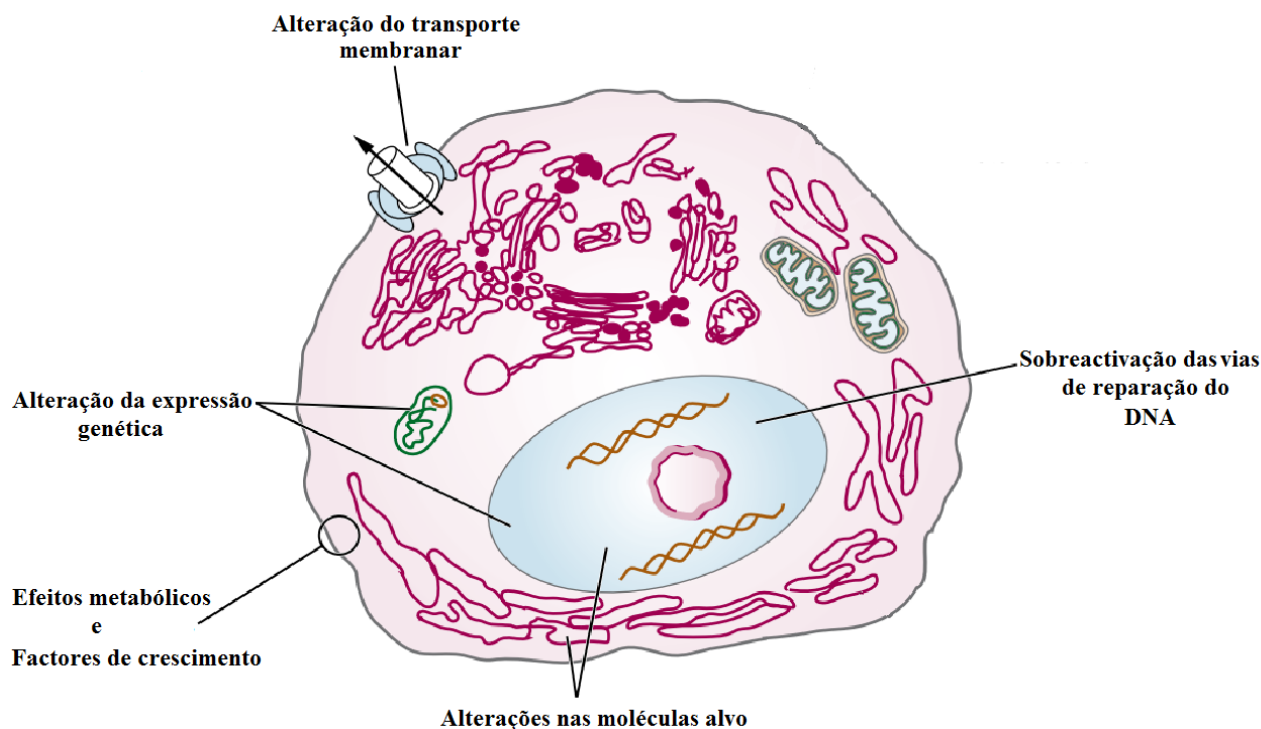


Figura 1.4: Mecanismos celulares de resistência aos compostos anti-tumorais (adaptado de Mendelsohn *et al.*, 2008).

1.2.2.1. Alteração do transporte membranar

É provável que a forma mais significativa de resistência contra a variedade de agentes anti-neoplásicos, em uso actualmente, se deva à acção de um grupo de proteínas membranares (bombas de efluxo) que fazem a extrusão de moléculas citotóxicas, tornando a concentração intracelular do composto abaixo do limiar da citotoxicidade (Bencheikroun *et al.*, 1993; Luqmani, 2005).

Estes transportadores pertencem à superfamília ABC (do inglês: *ATP-Binding Cassette*) e tal como o acrónimo indica estas bombas de efluxo são dependentes de ATP ($ADP + P \leftrightarrow ATP$). No genoma humano existem pelo menos 48 genes que codificam proteínas que formam os transportadores ABC. Estes transportadores estão agrupados em 7 subclasses, de ABCA até ABCG, baseadas na organização genómica, ordem dos domínios e sequências homólogas. Estas proteínas membranares modulam a absorção, distribuição e excreção de vários xenobióticos, inclusive compostos anti-tumorais, lípidos e produtos metabólicos através do plasma e da membrana intracelular das células (Figura 1.5) (Fletcher *et al.*, 2010; Luqmani, 2005; Mendelsohn *et al.*, 2008).

A maioria dos mecanismos celulares de resistência aos compostos adquiridos pelas células cancerígenas deve-se à sobre-expressão de genes que codificam proteínas transportadoras MDR1/ABCB1, subgrupo *Multidrug Resistance Protein 1* (MRP1/ABCC1) e *Mitoxantrone Resistance* (MXR/ ABCG2) (Fletcher *et al.*, 2010; Litman *et al.*, 2000; Mendelsohn *et al.*, 2008).

Por exemplo, o transportador ABCB1 (referida na secção 1.2.1.1) confere resistência aos compostos em células cancerígenas, nomeadamente na presença de substratos antracíclicos, alcalóides da *Vinca*, Taxanos, Podofilotoxinas, Mitoxantronas e Dactinomicinas (Mendelsohn *et al.*, 2008).

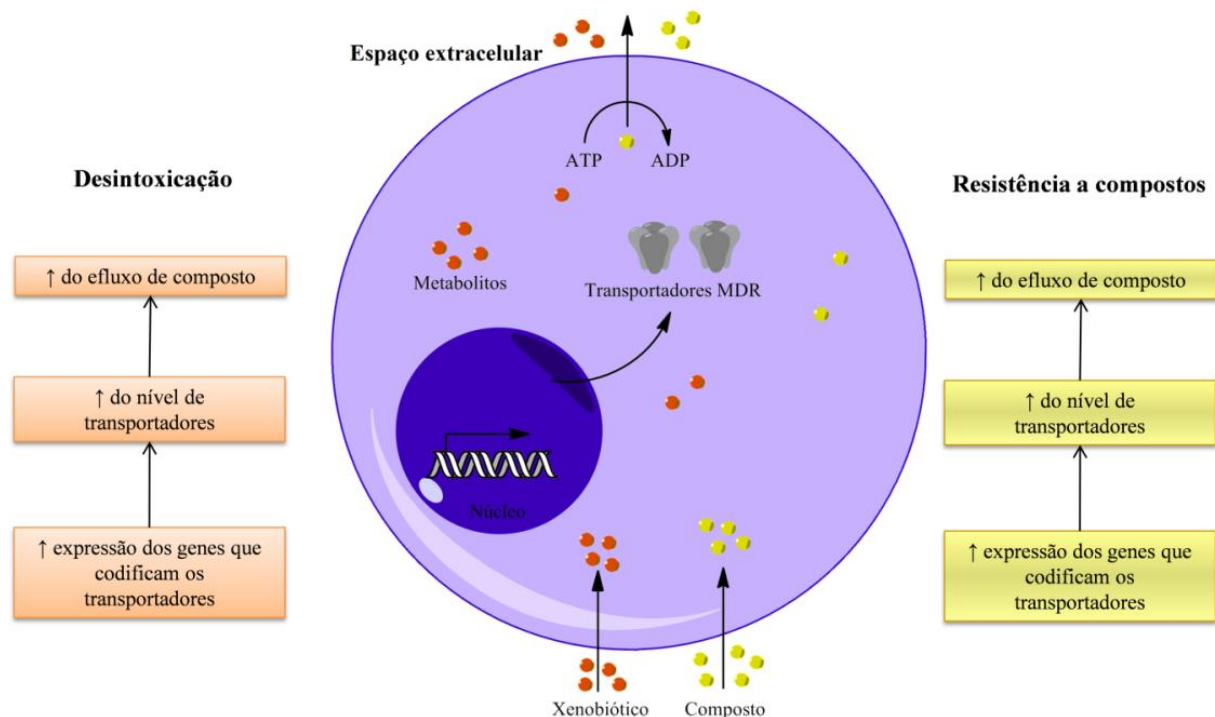


Figura 1.5: Mecanismos de desintoxicação e de resistência aos compostos na célula efectuados pelos transportadores MDR na presença de xenobiótico e de compostos anti-tumorais. Estes protegem a célula de moléculas tóxicas endógenas ou exógenas que entram por difusão ou por captação activa. O mecanismo de protecção proporcionado pelos transportadores ABC por extrusão de substâncias tóxicas independentemente de serem metabolitos ou compostos pode tornar as células tumorais resistentes ao efeito tóxico de diversos agentes anti-tumorais (adaptado de Fletcher *et al.*, 2010).

1.2.2.2. Alteração da expressão genética

A alteração da expressão de genes pode tornar as células cancerígenas resistentes a compostos anti-tumorais. A susceptibilidade das células tumorais à morte celular programada é influenciada por uma série de proto-oncogenes e de genes supressores de tumores.

As mutações que ocorrem na via de apoptose podem constituir um modo alternativo de resistência à terapia. A proteína p53 é um importante supressor tumoral que regula o ciclo celular, uma vez que é sensível a danos no DNA causados durante a replicação. Caso se verifiquem danos no DNA a p53 induz a paragem do ciclo celular na fase G1 e/ou induz a apoptose para prevenir a produção de células mutadas anómalas. Compostos que causam danos no DNA provocam morte celular mediada pela proteína p53. Em cancros humanos são frequentemente observadas mutações neste supressor tumoral levando à perda da sua função. Essa perda de função permite às células mutadas adquirirem resistência aos compostos anti-tumorais, escapando aos pontos de controlo do ciclo celular possibilitando assim a sua replicação (Luqmani, 2005; Mendelsohn *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2003).

Outros genes, como *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (K-RAS)* e *B cell lymphoma 2 (BCL-2)* estão envolvidos nos processos de resistência pelas células tumorais. Este tipo de resistência afecta toda uma gama de compostos anti-tumorais aumentando a proporção de células mutantes sobreviventes, conduzindo a uma maior heterogeneidade do tumor e consequentemente a um obstáculo no tratamento (Boyle e Levin, 2008; Luqmani, 2005).

1.2.2.3. Alteração nas moléculas alvo

Durante a quimioterapia, podem ocorrer alterações nas moléculas alvo tornando as células tumorais resistentes aos compostos aplicados tais como, mutações no gene codificante da proteína ou perda cromossómica da célula que induzem a perda de função da molécula alvo. Essas perdas podem resultar na alteração da via de expressão e via de regulação de genes, inclusive na deleção ou amplificação de DNA, alteração na transcrição ou no controlo pós-transcricional ao nível do RNA e modificações pós-transducionais em proteínas (Hong *et al.*, 2010).

Um exemplo de alteração da molécula alvo é a DHFR, que em células mutadas para esta proteína torna-as resistentes ao composto Metotrexato. Outro exemplo, alteração na β -tubulina através de mutações ou variação do número de isoformas (Hong *et al.*, 2010; Mendelsohn *et al.*, 2008).

As enzimas topoisomerases I e II têm um papel fundamental na replicação do DNA sendo por isso o alvo preferencial da quimioterapia. Mutações ou alterações na expressão destas enzimas tornam as células insensíveis aos compostos citotóxicos e assim resistentes ao tratamento (Hong *et al.*, 2010; Mendelsohn *et al.*, 2008).

A penetração dos compostos anti-tumorais no local de acção é um obstáculo que deve ser considerado como forma de resistência. A porção central de numerosos tumores tende a ser pouco vascularizada tendo os compostos dificuldades em aceder a essas áreas. Outros tumores de difícil acesso por quimioterapia são os tumores cerebrais devido à barreira hematoencefálica (BHE), estrutura extremamente selectiva do sistema nervoso central. Esta barreira tem como principais funções manter a homeostasia do sistema nervoso central, proteger o cérebro do meio extracelular, fornecer nutrientes através de sistemas de transporte específicos e orientar as células inflamatórias em caso de alterações ambientais locais. Quando ultrapassada a BHE, estes compostos podem ser bloqueados pelo sistema de defesa da BHE, como por exemplo o transportador ABCB1 referido na secção 1.2.1.1 (Cardoso *et al.*, 2010; Luqmani, 2005).

1.2.2.4. Sobre-activação das vias de reparação do ácido desoxirribonucleico

As vias de reparação do DNA pretendem proteger a integridade do genoma da célula e no caso de células cancerígenas são importantes intervenientes na resposta a agentes alquilantes e compostos de platina, podendo promover a resistência aos compostos anti-tumorais.

A reparação do DNA por excisão de nucleótidos (NER do inglês: *Nucleotide Excision Repair*) é um processo complexo e altamente regulado que envolve mais de trinta proteínas. Por norma, estão

envolvidas duas vias, a NER genómica global (que repara danos em áreas transcripcionais silenciosas) e a NER transcripcional (que repara danos na cadeia de DNA transcrita). O processo de NER decorre em diversas etapas: reconhecimento de danos no DNA, desenrolamento da cadeia, corte, degradação, polimerização e ligação dos nucleótidos (Berwick e Vineis, 2000; Hong *et al.*, 2010; Mendelsohn *et al.*, 2008).

Dos genes envolvidos na NER, o gene *Excision Repair Cross-Complementing group 1* (*ERCC1*) foi reconhecido como gene responsável pelo mecanismo de resistência aos compostos anti-tumorais, uma vez que repara os danos causados pela ligação de aductos DNA-composto como é o caso de agentes alquilantes ou compostos de platina (Luqmani, 2005; Mendelsohn *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2003)

Outro exemplo de mecanismo de resistência aos compostos é o da enzima O₆-alquil-guanina-DNA-alquil-transferase codificada pelo gene Metil-Guanina-Metil-Transferase (*MGMT*) que, inibe a morte de células tumorais removendo o grupo alquil do O₆ da guanina do DNA da célula quando exposta a agentes alquilantes (Esteller *et al.*, 2000a; Mendelsohn *et al.*, 2008; Rajewsky e Müller, 2002; Zaboikin *et al.*, 2006).

1.2.2.5. Efeitos metabólicos

As vias metabólicas (catabólicas e anabólicas) são processos químicos altamente regulados que permitem gerir as fontes energéticas, de transporte e síntese de moléculas nas células. Estes processos fornecem energia às células e produtos endógenos e exógenos como por exemplo xenobióticos (Berg *et al.*, 2007; Mathieu, 2004; <http://ghr.nlm.nih.gov>, acedido a 22/07/2011).

Alterações de proteínas envolvidas nas vias metabólicas podem tornar as células cancerígenas resistentes a compostos anti-tumorais permitindo mais uma vez que as células escapem ao controlo do sistema imunitário.

Os xenobióticos são frequentemente responsáveis pela modificação de apolipoproteínas de alta densidade. Esta alteração provoca um aumento da eliminação hepática do composto anti-tumoral, reduzindo sua concentração plasmática efectiva (Luqmani, 2005).

O citocromo P450-3A4 é uma isoforma da enzima monooxigenase presente no fígado que metaboliza xenobióticos. Quando esta isoforma é expressa em tumores, ocorre redução significativa dos efeitos anti-tumorais (Basseville *et al.*, 2011)

A glutathione S-transferase pertence à família de proteínas metabolizadoras que protegem as células da oxidação, desintoxicando-as de metabolitos contendo grupos carbonil, peróxido e epóxido. Este grupo de proteínas é também conhecido por ser sobre-expresso em células cancerígenas e por promover a desintoxicação dos xenobióticos através do transportador ABC codificado pelo gene MRP1/ABCC1, tornando o tumor resistente a compostos alquilantes (Hong *et al.*, 2010; Schenk *et al.*, 2003; Zaboikin *et al.*, 2006).

As proteínas cinases desempenham um papel fundamental no crescimento celular permitindo a transmissão de sinais do meio extracelular, através da fosforilação de outras proteínas. Por exemplo, na presença de forbol ester, 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato, um indutor tumoral, há activação da proteína cinase *c* que por sua vez irá fosforilar activadores de transcrição de oncogenes contribuindo assim para o desenvolvimento de células cancerígenas (Mendelsohn *et al.*, 2008; Ptashne e Gann, 2002)

1.2.2.6. Factores de crescimento

Os factores de crescimentos são moléculas biológicas específicas de pequenas dimensões, normalmente proteínas, necessárias ao desenvolvimento das células. Estas proteínas têm como principal papel enviar sinais químicos às células para estimular ou inibir a divisão celular e assim manter a homeostasia nos tecidos (Hanahan e Weinberg, 2011; Mathieu, 2004).

Na maioria dos casos, nas células cancerígenas, os sinais químicos são transmitidos por factores de crescimento que se ligam a receptores da proteína tirosina cinase. As células cancerígenas adquirem a capacidade de proliferação desregulada através de diversos mecanismos, nomeadamente através de estímulo autócrino produzindo factores de crescimento ou enviando sinais às células circundantes para que estas produzam os factores de crescimento necessários, ou desregulando / alterando estruturalmente os receptores de factores de crescimento, aumentando assim a quantidade de ligandos que chega aos receptores de factores de crescimento na superfície celular. (Hanahan e Weinberg, 2011).

Por exemplo, quando nas células tumorais há produção do ligando do factor de crescimento transformante alfa (TGF- α do inglês: *Transforming Growth Factor α*) ocorre sobre-expressão do receptor do factor de crescimento da epiderme (EGFR do inglês: *Epidermal Growth Factor Receptor*) levando à sobrevivência autócrina das células cancerígenas e resistência à quimioterapia (Camp *et al.*, 2005; Longley e Johnston, 2005).

Outro exemplo é a interleucina-6 (IL-6) que possui um papel importante na hematopoiese, processo de inflamação e oncogénese induzindo a produção do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor*). A produção autócrina de IL-6 pode promover a resistência a agentes citotóxicos empregues na quimioterapia. O mecanismo dessa resistência foi atribuído à activação do *enhancer* CCAAT da família de proteínas de ligação de factores de transcrição e da indução da expressão do gene *MDR1* (Boyle e Levin, 2008; Luqmani, 2005).

1.3. Complexos de escorpionato

Na natureza, existe uma grande variedade de enzimas com iões metálicos envolvidas em processos biológicos fundamentais como a fotossíntese, respiração e a fixação de azoto. Os iões metálicos são relevantes nos sistemas vivos e essenciais à vida porque permitem às enzimas exercer as suas funções catalíticas. Sendo assim, nos últimos anos o ramo da Química que estuda as metaloproteínas tem sintetizado compostos com iões metálicos no seu centro activo, baseando-se no ligando poli(pirazolil)borato. Esta classe de ligandos foi sintetizada pela primeira vez pelo químico Swiatoslaw Trofimenko em 1966, que os denominou como escorpionato (Pellei *et al.*, 2009; Pettinari, 2008).

Hoje em dia, existem imensas variedades de ligandos de escorpionato que mimetizam as características estruturais e funcionais de enzimas que contêm vários metais tais como vanádio, manganésio, ferro, cobalto, cobre, zinco, níquel, tungsténio e molibdénio (Pellei *et al.*, 2009; Pettinari, 2008). Segundo alguns autores existem complexos de escorpionato com actividade anti-tumoral *in vitro* (Marzano *et al.*, 2006; Panini, 2007; Pellei *et al.*, 2004).

Considerando este facto, nesta dissertação foram estudados dois complexos de escorpionato, nomeadamente o TS199 e CoMeOH, a fim de averiguar as suas potenciais actividades como agentes anti-tumorais.

1.3.1. TS199

O composto vulgarmente denominado por TS199 (Figura 1.6) tem como fórmula molecular $[\text{CuCl}_2\{\text{HOCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}]$ e massa molecular de $366,69\text{g.mol}^{-1}$, quando dissolvido em água apresenta uma cor azul clara. Este composto de escorpionato possui um centro de cobre II e um radical funcional de tris(pirazolil)etanol $[\text{ROCH}_2\text{C}(\text{pz})_3]$ que confere uma elevada natureza hidrofílica permitindo a solubilidade em água ($S_{25^\circ\text{C}}=15\text{mg/mL}$) (Silva *et al.*, 2009).

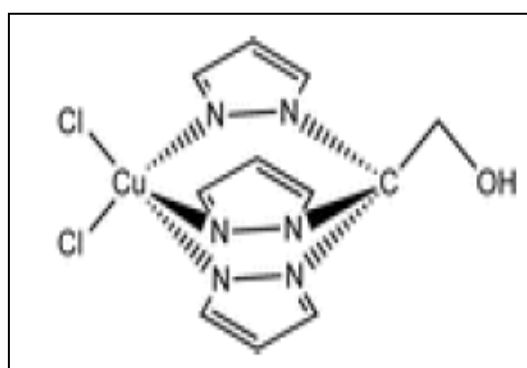


Figura 1.6: Fórmula estrutural do composto $[\text{CuCl}_2\{\text{HOCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}]$ (conhecido por TS199) (Silva *et al.*, 2009).

1.3.2. CoMeOH

O composto comumente denominado por CoMeOH (Figura 1.7) tem a seguinte fórmula molecular $[\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}_2] \cdot [\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}(\text{H}_2\text{O})_3]_2(\text{Cl})_6$ e massa molecular de $1582,75\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, em solução apresenta uma coloração laranja. Este complexo de escorpionato possui um centro de cobalto e um ligando de tris(pirazolil)etanol $[\text{ROCH}_2\text{C}(\text{pz})_3]$ que tal como no caso do TS199 confere uma elevada natureza hidrofílica permitindo a sua solubilidade em água.

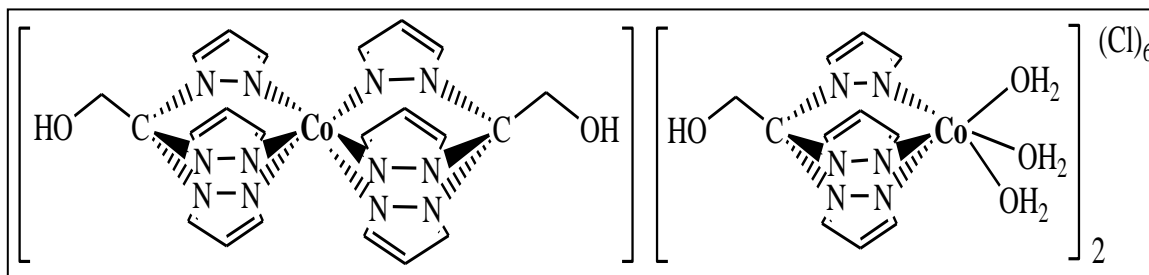


Figura 1.7: Fórmula estrutural do composto $[\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}_2] \cdot [\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}(\text{H}_2\text{O})_3]_2(\text{Cl})_6$ (designado CoMeOH).

1.4. Sistemas Modelo

No início do século XX, a expressão “sistema modelo” englobava apenas uma pequena porção da biodiversidade existente na Terra. Os organismos eram estudados para obter informação em várias áreas como a Genética, Biologia do Desenvolvimento e Evolução (Hedges, 2002).

Na última década, o termo sistema modelo, tem adquirido uma definição mais específica depois da sequenciação de genomas completos que permitiram comparar as diferentes espécies aumentando e rentabilizando a utilização de sistemas modelo na investigação (Hedges, 2002).

Existe uma grande variedade de sistemas modelo distribuídos pelos vários Reinos, nomeadamente nos Reinos Monera, Protista, Fungi, Plantae e Animalia (Hedges, 2002). O factor económico é um dos mais relevantes na escolha do sistema modelo utilizado, sendo ponderados outros parâmetros tais como, a área de investigação, a adequação do sistema modelo, o espaço logístico necessário à manutenção desse mesmo sistema.

Devido à grande variedade de sistemas modelo, no âmbito deste trabalho, serão apenas focados dois sistemas eucariotas, nomeadamente as linhas tumorais humanas (cancro colorectal humano 116 (HCT116) e carcinoma hepatocelular 2 (HepG2)) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), abordando-se as vantagens e desvantagens de cada um.

1.4.1. Ciclo celular de um eucariota

O ciclo celular é um fenómeno biológico que tem por função a duplicação precisa da vasta quantidade de DNA que se encontra empacotada nos cromossomas (Alberts *et al.*, 2002; Azevedo, 1999; Mathieu, 2004).

A proliferação celular é controlada de modo a que a produção de novas células compensa a perda de células nos tecidos (Azevedo, 1999).

O ciclo celular dos eucariotas ocorre quando uma célula (célula-mãe) está em divisão e compreende as fases da interfase e da mitose (Figura 1.8). A interfase é a fase mais longa do ciclo celular (cerca de 90%) e corresponde a um período de crescimento celular e de cópia dos cromossomas. Esta fase é dividida em 3 fases: fase G_1 , em que ocorre crescimento celular; fase S, onde ocorre a síntese do DNA e a continuação do crescimento celular e fase G_2 , onde a célula continua a crescer preparando-se para a mitose. Na mitose ocorre a divisão da célula-mãe e a distribuição dos cromossomas pelas células-filhas. Por fim, o ciclo fica completo com a citocinese, onde ocorre a divisão do citoplasma obtendo-se duas células-filhas geneticamente idênticas e independentes (Alberts *et al.*, 2002; Mathieu, 2004).

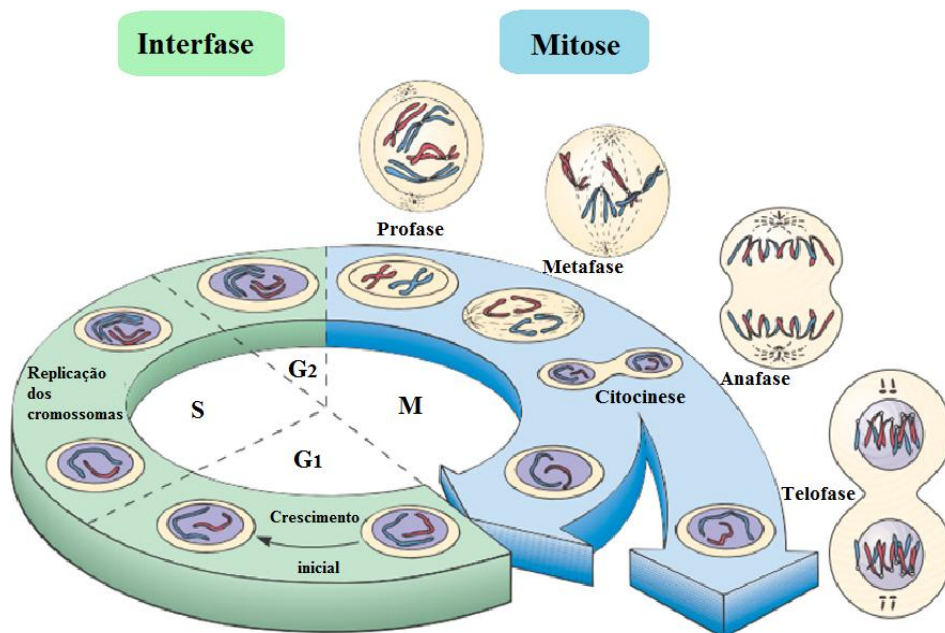


Figura 1.8: Ciclo celular em organismos Eucariotas. **Legenda:** M - Mitose (adaptado de Prescott *et al.*, 2005).

1.4.2. Linhas celulares cancerígenas (modelo *ex vivo*)

A cultura celular de linhas tumorais é extensamente executada em todo o mundo. A grande vantagem em utilizar este tipo de células, reside na capacidade de fornecer uma fonte renovável de material para estudos repetitivos em simultâneo em diversos laboratórios. No entanto, a linha tumoral como sistema modelo (modelo *ex-vivo*) deve reflectir as propriedades do cancro original, isto é, manter as características histopatológicas quando transplantado, as características genotípicas e fenotípicas, a expressão de genes e a sensibilidade aos fármacos. Outra vantagem deste tipo de linhas celulares é o facto de estas poderem ser submetidas a um número indefinido de divisões. As linhas

imortalizadas têm a capacidade de se dividirem milhares de vezes. No entanto, devido ao seu crescimento descontrolado, este tipo de linhas nem sempre mimetiza as doenças com exactidão. É ainda importante ter em atenção a possibilidade de desenvolvimento de mutações adicionais, sendo necessário efectuar controlos de qualidade para validação dos resultados. Estes controlos incluem entre outros, a pesquisa de mutações adicionais e a observação microscópica para verificação de alterações morfológicas como por exemplo aberrações cromossómicas (Langdon, 2003).

As linhas celulares podem existir sobre duas formas de cultura: culturas aderentes ou em suspensão. As culturas aderentes necessitam de um substrato, como por exemplo plástico ou vidro, para proliferar em monocamada. As culturas em suspensão não necessitam de substrato e desenvolvem-se flutuando no meio (Langdon, 2003).

Neste trabalho serão abordadas duas culturas aderentes ao substrato: linhas celulares humanas HCT116 e HepG-2.

1.4.2.1. Células de cancro colorectal humano

Como referido inicialmente, o cancro colorectal encontra-se entre os cancros com maior incidência a nível mundial. Esta incidência aumenta com a idade, predominando entre os 60 e 70 anos. No entanto, em indivíduos com predisposição genética ou em condições pré-existent de doenças inflamatórias dos intestinos o aparecimento desta neoplasia pode ser mais precoce (Langdon, 2003; <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs297/fr/index.html>, acedido a 07/01/2011).

O cancro colorectal inicia-se nas células que revestem o interior do cólon e nas células do recto, começando um desenvolvimento lento a partir de pólipos (Figura 1.9)

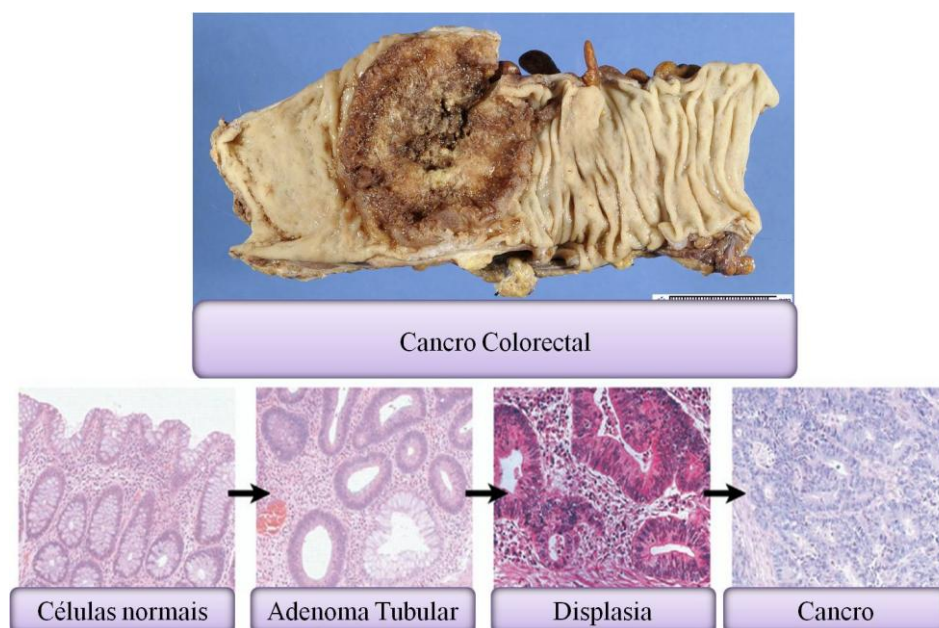


Figura 1.9: Representa a progressão do cancro colorectal (adaptado de Grady e Carethers, 2008; <http://www.humpath.com>)

Os factores de risco associados a este cancro são uma má alimentação, excesso de peso, tabagismo, ingestão de álcool, diabetes e a predisposição genética. (<http://www.colorectal-cancer.ca/en/>, acedido a 27/01/2011; http://www.pfizer.com/files/news/asco/colorectal_cancer_crc_fact_sheet_2010.pdf, acedido a 29/01/2011).

Relativamente a predisposição genética, os genes envolvidos e relacionados com a carcinogénese colorectal podem ser divididos segundo a sua função putativa.

Os genes envolvidos nas vias de sinalização celular são:

- Gene supressor de tumor *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, envolvido na activação da via de sinalização Wnt/ β -catenina;
- Oncogene *K-RAS*, envolvido em vias de transdução de sinais;
- Gene *Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC)*, envolvido na via de transmissão de sinal axónico.

Os genes envolvidos na manutenção da estabilidade genética são por exemplo:

- Proteína p53;
- Genes de reparação de *mismatch (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, e hMSH6)* (Esteller *et al.*, 2000b; Grady e Carethers, 2008; Langdon, 2003; Wheeler e Brändli, 2009; Wood *et al.*, 2007; Yokota, 2000).

As linhas celulares de cancro colorectal humano são uma ferramenta muito utilizada em estudos celulares biológicos, como o desenvolvimento de novas terapias. Estas linhas celulares podem ser estabelecidas a partir de efusões ascíticas, tecidos metastáticos e tumores primários (Langdon, 2003).

A linha celular de HCT116 é uma das linhas celulares de cancro colorectal humano disponível comercialmente e possui as seguintes características:

- Tumorigénica;
- Positiva para a queratina quando corada por imunoperoxidase;
- Positiva para a transformação do factor de crescimento beta-1 (TGF β 1) e para a expressão de beta-2 (TGF β 2);
- Mutação no codão 13 do proto-oncogene *Ras*
- Tempo de duplicação 25-48 horas, incubação a 37°C e 5% CO₂. (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=HCT116>, acedido a 27/01/2011; http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=581&from=cell_line_index&select=H&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0, acedido a 27/01/2011)

1.4.2.2. Células de carcinoma hepatocelular

O carcinoma hepatocelular está entre os cânceros de maior incidência a nível mundial, frequentemente recorrente e letal, prevalendo em indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 50 e os 60 anos (Boyle e Levin, 2008).

O carcinoma hepatocelular é um tumor epitelial com início nos hepatócitos do fígado (Figura 1.10), devendo-se maioritariamente a uma cirrose causada por consumo excessivo de álcool; doenças auto-imunes ou inflamatórias de longa duração; hepatites B e C crónicas; e ainda, elevados níveis de iões no organismo. A remoção por hepatectomia ou o transplante são recursos utilizados na terapêutica, no entanto são complementados com quimioterapia (químio-embolização) e radioterapia. (Boyle e Levin, 2008; Gérolami *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000280.htm>, acedido a 27/01/2011)

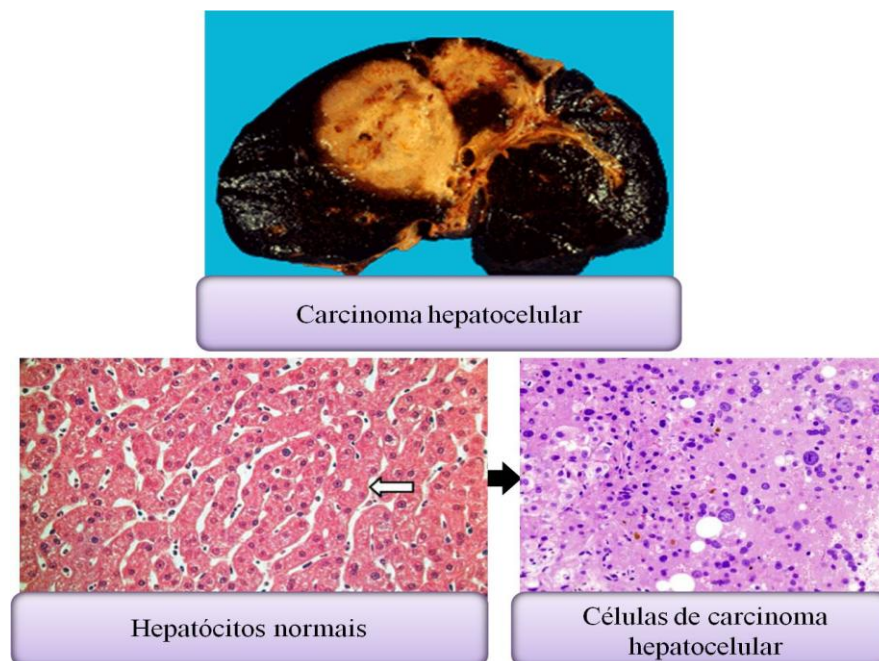


Figura 1.10: Representa a progressão do carcinoma hepatocelular (adaptado de Hussain *et al.*, 2002; <http://www.hephelp.net>; <http://pathweb.uchc.edu>).

O desenvolvimento e a progressão deste cancro, à semelhança de outros cânceros, deve-se a modificações genéticas, nomeadamente:

- Gene *K-RAS*, envolvido nas vias de transdução de sinais;
- Gene *Tumor protein p53 (TP53)*, balanceia a divisão celular e a apoptose;
- Gene *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)* participa na regulação do ciclo celular;
- Gene *Retinoblastoma (Rb)* envolvido na regulação da fase G1 do ciclo celular;
- Gene Wnt / Proteína β -catenina, envolvida na adesão entre células;

- Transformação no TGF- β , participa no controlo do crescimento celular e apoptose; (Boyle e Levin, 2008; Gérolami *et al.*, 2003; <http://www.genenames.org>, acessido a 27/07/2011; <http://atlasgeneticsoncology.org>, acessido a 27/07/2011)

A linha celular HepG-2 é amplamente usada na investigação de cancros hepáticos e no efeito de compostos anti-neoplásicos, tendo um tempo de duplicação de 50-60 horas, incubação a 37°C e 5% CO₂ (Hammer *et al.*, 2009; http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=180&term=hEP&highlight=, acessido a 27/01/2011).

1.4.3. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Há milénios que o Homem utiliza as leveduras em várias indústrias, como por exemplo na vinificação, produção de lacticínios, panificação e produção de cerveja. A levedura mais utilizada na indústria é a *S. cerevisiae*, que permite produzir pão e cerveja (Lima e Mota, 2003; Mathieu, 2004; Mell e Burgess, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* pertence ao grupo dos ascomicetas no Reino Fungi. É um organismo eucariota unicelular com reprodução assexuada ou sexuada dependendo das condições ambientais. Outras características importantes são o facto de não possuir mobilidade, não ser patogénica, possuir um ciclo de vida curto, possuir a mesma arquitectura celular do que eucariotas multicelular, ou seja, possui numerosos organelos ligados à membrana, incluindo núcleos, mitocôndrias, peroxissomas e organelos das vias de secreção; ser de fácil cultivo e manipulação em laboratório. A nível genómico algumas características importantes são: o seu genoma completo sequenciado; um conjunto de genes *knock-out* não essenciais caracterizados; obtenção a baixo custo de grelhas de leitura (ORF, do inglês: *Open Reading Frame*) e bibliotecas genómicas; e por fim a existência de uma base de dados *online* bem desenvolvida e de fácil acesso em <http://www.yeastgenome.org/>. Todas estas características fazem da *S. cerevisiae* um organismo modelo desejado na área da investigação, permitindo estudos de Bioquímica, Genética, Biotecnologia e Biologia Celular dos eucariotas (Mathieu, 2004; Mell e Burgess, 2002).

O genoma haplóide da levedura *S. cerevisiae* é composto por aproximadamente 6000 genes que se encontram distribuídos por 16 cromossomas lineares contidos no núcleo da célula (Bjornsti, 2002; Mell e Burgess, 2002). O genoma é muito compacto uma vez que o número e o tamanho dos genes é pequeno e a densidade de genes é relativamente elevada. Os genes da levedura têm poucos intrões e as regiões intergénicas são muito curtas. A redundância genética no genoma da levedura é baixa, o que facilita a análise da função dos genes. Por outro lado, os genes e os mecanismos envolvidos em processos celulares estão altamente conservados em *taxa* eucariotas, podendo-se extrapolar os resultados obtidos na *S. cerevisiae* para outros eucariotas (Mell e Burgess, 2002).

Este eucariota unicelular, apesar da sua simplicidade em relação a organismos multicelulares, utiliza mecanismos idênticos aos eucariotas mais complexos. De facto, muitos dos genes da levedura

estão relacionados evolutivamente e funcionalmente com genes de eucariotas superiores, reforçando mais uma vez a sua utilização como organismo modelo (Mell e Burgess, 2002).

1.4.3.1. Ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O ciclo de vida da levedura *S. cerevisiae* é muito curto, aproximadamente 90 minutos, o que permite crescer rapidamente uma elevada população deste organismo (Mell e Burgess, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* pode existir indefinidamente sobre a forma haplóide ou sobre a forma diplóide (Figura 1.11) contendo uma cópia ou duas de cada cromossoma, respectivamente. As leveduras haplóides podem ter duas formas, *mating type* *a* e *mating type* α . Na reprodução sexuada ocorre a junção de duas células haplóides de diferente *mating type* formando-se uma célula diplóide com 4 gâmetas, dois de cada *mating type*, denominada de asco na qual estão contidos os ascósporos. Quando o zigoto sofre mitose obtêm-se colónias diplóides. Quando a forma diplóide sofre meiose obtêm-se quatro células haplóides (Madigan e Martinko, 2006; Mell e Burgess, 2002).

A levedura na sua forma diplóide multiplica-se por gemulação sofrendo um ciclo celular idêntico ao explicado na secção 1.4.1.. Esta, difere apenas na mitose devido à ausência de separação do envelope nuclear ou metafase durante a divisão celular.

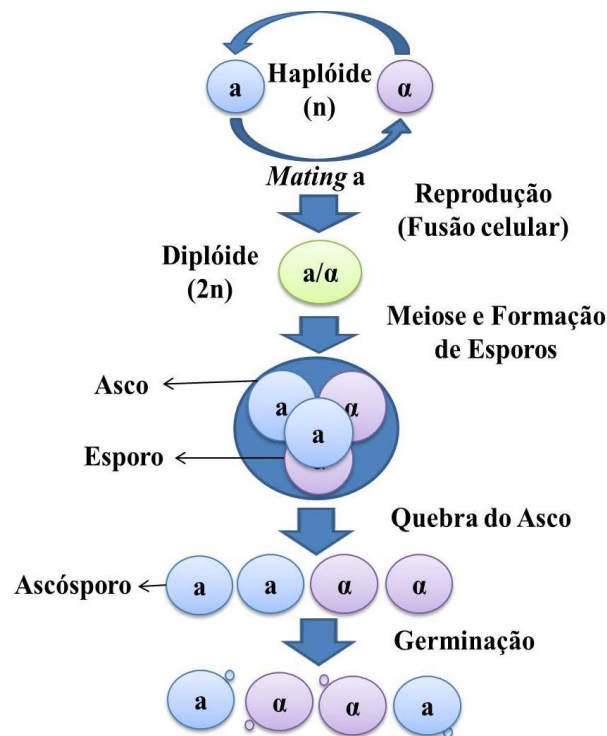


Figura 1.11: Ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Legenda:** *a*- *Mating-type a*, α - *Mating-type α* (adaptado de Herskowitz, 1988).

1.4.3.2. Crescimento microbiano

O crescimento microbiano é dependente do meio de cultura líquido apropriado, temperatura e agitação constante de modo a que todas as células estejam em suspensão e em contacto com o meio de modo equitativo (Lopes e Fonseca, 1996).

O crescimento da levedura em sistema fechado ocorre por reprodução assexuada e pode ser representado pelo gráfico do logaritmo do número de células viáveis em função do tempo (Figura 1.12) (Prescott *et al.*, 2005).

Sendo assim, o comportamento de uma cultura de levedura em sistema fechado é caracterizado por quatro fases principais. A primeira denomina-se de fase de latência e ocorre imediatamente após a inoculação do meio. A fase seguinte caracteriza-se por um pequeno aumento da população denominando-se de fase de aceleração. Segue-se uma fase de crescimento, fase exponencial, onde o valor da taxa específica de crescimento (μ_c) atinge o seu valor máximo ($\mu_{máx}$) para as condições testadas. A quarta fase é a fase de desaceleração que ocorre devido a um ou mais nutrientes se tornarem limitantes ao crescimento. Posteriormente, ao esgotamento de nutrientes e/ou acumulação de produtos inibitórios do metabolismo, a levedura deixa de se dividir e entra na fase estacionária. Por fim, observa-se um declínio da população viável ao longo do tempo, característico da fase de morte (Ferreira e Sousa, 1998; Lopes e Fonseca, 1996; Madigan e Martinko, 2006; Prescott *et al.*, 2005).

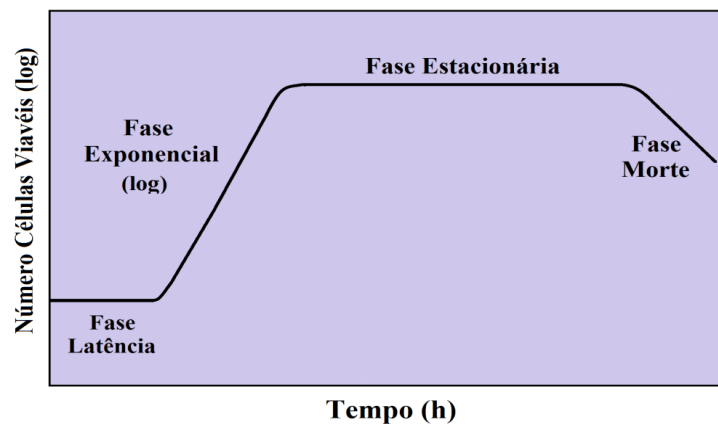


Figura 1.12: Esquema do crescimento da levedura *S. cerevisiae* em sistema fechado. Estão representadas as quatro principais fases de um crescimento de levedura: latência, exponencial, estacionária e morte celular. (adaptado de Prescott *et al.*, 2005).

1.5. Proteómica

O termo proteómica refere-se ao estudo do proteoma (sistema dinâmico) dos organismos, ou seja, baseia-se no conjunto de proteínas produzidas pelas células, quando sujeita a um conjunto de condições, reflectindo assim as alterações do meio envolvente e os mecanismos biológicos envolvidos. Sendo assim, uma análise proteica da célula permite uma perspectiva global de como as moléculas interagem e cooperam para criar e manter um sistema biológico funcional. Esta tecnologia detecta a quantidade, composição e estrutura das proteínas, isoformas proteicas, modificações conformacionais,

alterações modulares durante o desenvolvimento, modificações pós-transducionais, interações com outras proteínas ou metabolitos e distribuição subcelular das proteínas fornecendo uma fonte rica e variável de dados (Graves e Haystead, 2002; Josic e Kovac, 2008; Patterson e Aebersold, 2003; Rédei, 2008; Twyman, 2004).

A proteômica não se limita a identificar proteínas da célula, pretende também chegar a um complexo mapa em três dimensões que permite identificar a localização das proteínas na célula. (Graves e Haystead, 2002; Patterson e Aebersold, 2003).

A proteômica fornece uma grande variedade de dados e por isso é necessário tratar os dados com o auxílio de programas computacionais para tratar toda a informação. Hoje em dia, a informação obtida por proteômica tem um impacto importantíssimo nas aplicações biológicas como a Medicina, desenvolvimento de novos compostos e agricultura (Rédei, 2008; Twyman, 2004).

As principais abordagens da proteômica são:

- A proteômica Funcional que estuda directamente funções específicas de proteínas em larga escala através de *chips*;
- A proteômica Estrutural que procura entender a função proteica baseando-se na análise e modelação tridimensional;
- A proteômica Reversa que inicia o estudo nos genes e vai até a identificação das proteínas;
- A proteômica de Expressão que permite analisar todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo quando este é exposto à alterações no meio ambiente (Rédei, 2008; Twyman, 2004).

A proteômica de Expressão, técnica utilizada neste trabalho, envolve a separação de uma mistura complexa de proteínas extraídas de células, tecidos ou outra amostra biológica, através da técnica de electroforese em duas dimensões (2-DE do inglês: *Two Dimension Electroforese*) executada em gel de poliacrilamida. Esta técnica envolve também a identificação visual e individual dos “spots” de interesse e a sua análise após identificação por Espectrometria de Massa (MS do inglês: *Mass Spectrometry*).

A técnica de 2-DE executa-se em duas fases, separando as proteínas de acordo com duas propriedades independentes: o ponto isoeléctrico e o peso molecular das proteínas. Esta técnica é sensível e tolera a utilização de misturas proteicas e é a única com capacidade de detectar modificações pós e co-transducionais. A 2-DE pode ter diversas utilizações como por exemplo, análise de proteoma, diferenciação celular, detecção de marcadores de doença, monitorizar tratamentos, pesquisa de compostos, investigação oncológica e purificação de proteínas em microescala (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2010; Graves e Haystead, 2002; Rédei, 2008; Twyman, 2004).

A técnica de MS permite obter informações estruturais (massa, sequência) de proteínas a partir dos seus derivados, péptidos ou iões proteicos. Essa informação é importante para identificar as proteínas utilizando-se bases de dados proteicas e também para identificar a localização ou

modificação pós-transducional de proteínas (Figeys, 2005; Graves e Haystead, 2002; Honoré *et al.*, 2004; Nesatyy e Suter, 2008; Patterson e Aebersold, 2003; Teixeira *et al.*, 2009).

Por todas as razões enumeradas anteriormente, a técnica de proteómica de Expressão demonstra ser uma técnica de grande utilidade no presente estudo.

1.6. Objectivo do estudo

Com o presente estudo, enquadrado no trabalho desenvolvido nesta unidade de investigação, pretendeu-se averiguar o potencial citostático de dois complexos de escorpionato, denominados de TS199 e CoMeOH.

Foram utilizadas duas abordagens para que o objectivo proposto fosse alcançado.

Deste modo, uma das abordagens consistiu na determinação da citotoxicidade e morte celular, em ensaios *ex-vivo* nas linhas tumorais humanas HCT116 e HepG2, através de ensaios de MTS e de coloração pelo método de Hoechst.

No que concerne à outra abordagem, tentou-se elucidar quais os alvos e modos de acção dos composto em estudo, no modelo estirpe BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta abordagem, foi alcançada através da caracterização da concentração mínima inibitória (CMI) e da curva de crescimento, determinação da viabilidade celular e actividade de ROS e ainda, o estudo do proteoma.

2. Materiais e Métodos

2.1. Compostos em estudo

No presente trabalho, utilizou-se a Doxorrubicina como controlo positivo devido ao seu potencial anti-tumoral comprovado. Este composto foi adquirido comercialmente através da empresa Toronto Research Chemicals (TRC, <http://www.trc-canada.com>, Canadá).

Os compostos em estudo (TS199 e CoMeOH) são complexos de escorpionato previamente caracterizados na introdução deste estudo. Estes compostos foram sintetizados pela Telma Silva aluna de Doutoramento no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico (IST).

Para efectuarmos os estudos com os compostos acima referidos, foi necessário dissolvê-los num solvente apropriado. O composto Doxorrubicina foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (Applichem, Alemanha), numa concentração final de 43,10 mM. Os compostos teste, TS199 e CoMeOH, foram dissolvidos em água, nas concentrações stock de 18,19 mM e 37,90 mM, respectivamente. Todos eles foram conservados a -20 °C.

2.2. Linhas celulares HCT116 e HepG-2

Parte dos ensaios em linhas tumorais descritos na secção 2.2 foram desenvolvidos no *Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences* da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, ao abrigo de um protocolo de cooperação com a Professora Doutora Cecília Rodrigues e outra parte foi desenvolvida nas instalações da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

O trabalho apresentado na secção 3.3.1 foi desenvolvido em linhas celulares tumorais aderentes, HCT116 e HepG2.

2.2.1. Condições de cultura das linhas tumorais

Para a cultura celular de ambas as linhas tumorais foi necessário preparar um meio completo, composto por: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS; do inglês: *Fetal Bovine Serum*) (Invitrogen, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (solução de Penicilina/Streptomicina contendo um antimicótico; Invitrogen, EUA). Para a linha tumoral HepG2 suplementou-se ainda o meio completo com 1% da solução de aminoácidos (a.a.) (*MEM Non Essential Amino Acids*; Invitrogen, EUA). Os crescimentos de ambas as linhas foram efectuados em frascos BD Falcon™ de 75 cm² com tampa ventilada (BD Biosciences, EUA), numa incubadora HERA Cell 150i (Thermo Scientific, Waltham, Ma., EUA) em atmosfera húmida e controlada a 37°C e 5% CO₂.

2.2.2. Renovação de meio de cultura das linhas tumorais

A manutenção semanal das linhas celulares fez-se todas as 72h a partir de frascos de cultura crescida (meio completo + células) segundo as condições descritas na secção 2.2.1 com uma confluência entre 65-80%. A confluência foi verificada por observação em microscópio invertido. Esta percentagem de confluência foi tida em conta na realização dos ensaios descritos nas secções 2.2.4-2.2.6.

Para renovar as culturas e/ou efectuar os ensaios de viabilidade, o procedimento foi semelhante e consistiu na aspiração de todo o meio da cultura, com posterior adição de 5 mL de tripsina TrypLE™ Express (Invitrogen, EUA) e subsequente incubação a 37 °C, em 5% CO₂ cerca de 5 minutos, até as células se soltarem da base do frasco (confirmação por observação visual). Seguidamente, adicionaram-se 5 mL de meio completo (secção 2.2.1) para neutralizar a tripsina e aspirou-se o meio para um tubo de centrífuga de 50 mL. Centrifugou-se durante 5 minutos a \approx 230 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) e descartou-se o sobrenadante adicionando-se ao *pellet* 1 mL de meio completo novo para ressuspender as células cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta (obtem-se a suspensão celular). Por fim, sempre que necessário, adicionaram-se 2 mL de meio completo para diluir a suspensão.

Renovaram-se as culturas, adicionando-se 20 mL de meio completo aos frascos de cultura novos com 50 μ L de células ressuspensas. Por fim, colocaram-se os frascos novos na câmara de CO₂ nas condições descritas na secção 2.2.1.

2.2.3. Determinação da concentração celular viável das culturas

Para determinar a concentração celular viável das culturas tumorais procedeu-se ao ensaio de exclusão por azul de *trypan* (Sigma, EUA). Este método tem por base o facto de as células vivas não fixarem determinados corantes uma vez que possuem a membrana plasmática intacta que funciona como uma barreira, enquanto as células mortas fixam os corantes por terem a membrana plasmática danificada. Assim sendo, a estabilização da permeabilidade membranar permite a coloração diferencial das células não viáveis que coram de azul enquanto as viáveis permanecem sem coloração (Sigma, 2011; Strober, 1997).

Efectuou-se a contagem de células usando um hemocitómetro (Hirschmann, Alemanha), partindo de uma solução composta por: 50 μ L de suspensão celular (secção 2.2.2.), 100 μ L de azul de *trypan* 0,1% (Sigma, EUA) e 350 μ L de meio completo (volume total de amostra de 500 μ L).

Procedeu-se a contagem de células viáveis nos quatro quadrantes de uma das câmaras do hemocitómetro. O mesmo procedimento foi repetido na segunda câmara do hemocitómetro (para a realização do duplicado).

Determinou-se também, a percentagem de células não viáveis em cada ensaio de forma a assegurar que uma percentagem $< 5\%$.

De seguida, determinou-se a concentração celular a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Número células} = N * 10^4 * f_d$$

, onde o número de células é por mL, N é o valor médio do número de células viáveis nos quadrantes da câmara de contagem, 10^4 corresponde ao volume da câmara em mm^3 e f_d corresponde ao factor de diluição.

Seguidamente, determinou-se o volume de suspensão celular necessária para obter uma solução final (suspensão celular + meio completo) de concentração igual a $0,5 \times 10^5$ células/mL para os ensaios de viabilidade celular descritos na secção 2.2.5 e de $1,5 \times 10^5$ células/mL para os ensaios de apoptose descritos na secção 2.2.6.

2.2.4. Adição dos compostos em estudo às culturas de células

A adição de compostos em estudo às culturas tumorais foi efectuada após 24 horas de incubação das células a 37°C com 5% de CO_2 na placa de 96 poços ou de 35 mm consoante o ensaio a realizar e descrito nas secções 2.2.5. e 2.2.6 após ter confirmado, por observação da placa na lupa, simultaneamente a morfologia celular e a confluência de células de 80%.

Nas placas de 96 poços foram testadas as seguintes concentrações dos compostos Doxorrubicina 0,1, 1, 10, 125, 250 e 500 μM em linha HCT116; TS199 500, 700, 1000 e 2000 μM em linhas HCT116 e HepG2 e CoMeOH 100, 500, 1000 e 2000 μM em linhas HCT116 e HepG2 e foram também preparadas amostras controlo negativo (meio completo sem composto nem solvente (ensaio dos compostos TS199 e CoMeOH) e meio completo sem composto com solvente DMSO ($< 0,3\%$, ensaio do composto Doxorrubicina).

Posteriormente à adição dos compostos à placa de 96 poços, prepararam-se as soluções dos compostos em meio completo (suplementado com a.a. no caso da linha celular HepG2) em *Eppendorf* de 1,5 mL nas concentrações pretendidas. Aspirou-se o meio dos poços e adicionaram-se 100 μL /poço das amostras e do controlo negativo e incubaram-se as células a 37°C , com 5% CO_2 durante 48 horas.

Nas placas de 35 mm, as amostras testadas foram Doxorrubicina 0,5 μM , TS199 900 e 1500 μM , CoMeOH 250 e 500 μM em linha HCT116, foram também preparadas amostras controlo negativo tal como referido anteriormente.

Posteriormente à adição dos compostos à placa de 35 mm, prepararam-se as soluções dos compostos em meio completo em *Eppendorf* de 2,0 mL nas concentrações pretendidas. Aspirou-se o meio das placas de 35 mm e adicionaram-se 2000 μL /placas das amostras e dos controlos e incubaram-se as células a 37°C , com 5 % CO_2 durante 48 h.

2.2.5. Kit *CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*

Utilizou-se o Kit *CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EUA) para realizar o ensaio 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) e avaliar a viabilidade celular das linhas HCT116 e HepG2. Este método é colorimétrico e permite determinar o número de células viáveis em ensaios de proliferação

ou quimiosensibilidade, por leitura directa da densidade óptica (DO) do formazano a 490 nm (Promega, 2009).

Neste ensaio, utiliza-se um sal de tetrazólio e um reagente de fenazina metossulfato (PMS; do inglês: *Phenazine Methosulfate*). O MTS vai ser reduzido em formazano nas células metabolicamente activas pela enzima desidrogenase, sendo este um produto solúvel no meio de cultura. Assim, a quantidade de formazano produzido nesta reacção é directamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cultura (Promega, 2009).

A descrição sucinta do protocolo é a seguinte: preparou-se uma solução MTS : PMS : meio completo nas proporções de 20:1:100.

Utilizou-se a placa de 96 poços de fundo plano preparada na secção 2.2.3. e 2.2.4. na qual se ajustou a concentração por poço (volume de meio completo igual a 100 uL) a 5000 células e aspirou-se o meio dos poços. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL da solução contendo MTS/PMS/meio completo. Incubou-se durante 30 min a 37°C, e com 5% CO₂ para ocorrer a redução do MTS em formazano (mudança de cor para púrpura) e leu-se a DO a 490 nm num leitor de placas (Microplate Reader Mod. 680, BioRad, EUA).

A percentagem de viabilidade celular foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = 100 - \left((1 - \text{Abs}_{490} \frac{\text{Composto}}{\text{Controlo}}) * 100 \right)$$

, onde Abs_{490} é a absorvância da amostra a 490nm.

Este ensaio de viabilidade celular foi efectuado em triplicado tanto para os compostos Doxorrubicina, TS199, CoMeOH como para o controlo negativo de cada condição testada.

2.2.6. Marcação pelo método de Hoechst

Este ensaio de avaliação de indução de apoptose foi realizado em triplicado para todas as condições em estudo. As condições testadas foram Doxorrubicina a 0,5 µM; TS199 a 900 e 1500 µM e CoMeOH a 250 e 500 µM em linha HCT116.

Os corantes Hoechst são fluorescentes e têm por principal características serem permeáveis aos ácidos nucleicos das células. Esta característica permite a utilização destes corantes em diversas aplicações como por exemplo: detecção de DNA (> 3 ng) na presença de RNA em gel de agarose, determinar o número celular e distinguir cromossomas (Invitrogen, 2005).

Para realizar esta experiência, utilizou-se o corante Hoechst 33258 (Sigma, EUA) com excitação e emissão fluorescente no intervalo de 352-461 nm quando ligado ao DNA (Invitrogen, EUA). Este corante lipofílico possui elevada afinidade para a molécula de DNA e por isso a sua fluorescência é muito sensível à conformação do DNA e ao estado de compactação da cromatina, possibilitando a detecção de danos nucleares de vários graus (Invitrogen, 2005).

Utilizando as placas de 35 mm preparadas segundo o protocolo descrito nas secções 2.2.3 e 2.2.4, com uma concentração celular de $1,5 \times 10^5$ células/mL, para as linhas tumoral HCT116, aspirou-

se o meio usado e lavou-se as células três vezes com 1 mL de PBS 1X. Adicionou-se às células 1 mL de paraformaldeído 4% em PBS incubando 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. Lavou-se três vezes com 1 mL de PBS 1X. Adicionou-se às células 1 mL de solução Hoechst 33258 (1 µL Hoechst 33258 5 mg/mL por mL PBS 1X) (Sigma, EUA), incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente e lavou-se três vezes com 1 mL de PBS 1X. Adicionou-se 20 µL de uma solução PBS/ Glicerol 3:1 no centro da placa, colocou-se uma lamela por cima das células tratadas com auxílio de uma pinça. Por fim, observou-se ao microscópio óptico (Olympus BX51 (Japão)) com unidade de fluorescência (Olympus U-RFL-T (Japão)) e uma máquina fotográfica acoplada (Olympus DP50 (Japão)) e registaram-se os resultados através do programa *analySIS[®] Soft Imaging System* (versão 3.2.).

2.3. Estirpe BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*

No trabalho experimental apresentado na secção 3.3.1 desta dissertação, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* estirpe BY4741 (*MATa*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*) obtida comercialmente (European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Funcional Analysis (EuroScarf, <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>, Alemanha)).

2.3.1. Condições de cultura

A levedura *S. cerevisiae* BY4741 foi mantida a 4°C em meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) sólido composto por 30 g/L de glucose (HiMedia Laboratories, India); 5,0 g/L de extracto de Levedura (Biokar, Beauvais, França); 10,0 g/L de bactopectona (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e 30 g/L de agar (Merck, Alemanha).

O meio foi preparado em água destilada (dH₂O) e esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos a 121°C. As repicagens da levedura foram realizadas quinzenalmente a partir de placas, sendo posteriormente as novas placas incubadas numa estufa (Heraeus Instrumento D-63450, Alemanha) durante 48 h a 30°C.

2.3.2. Meio e condições de crescimento

A levedura *S. cerevisiae* BY4741 foi crescida em *Minimal Medium Broth* pH 4 (MMB4) líquido cuja composição foi 20 g/L de glucose, 2,65 g/L de sulfato de amónio (NH₄SO₄) (Riedel-deHaën, Alemanha) e 1,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sem a.a. e sem NH₄SO₄ (Sigma-Aldrich, USA).

O meio foi preparado em dH₂O, o seu pH ajustado para 4 e posteriormente esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos a 121°C (Teixeira *et al.*, 2005).

Sendo o MMB4 um meio pobre em nutrientes, foi necessário suplementar o mesmo com uma solução de a.a. constituída por 1,2 g/L de L-leucina (Sigma-Aldrich, EUA); 0,4 g/L de L-metionina

(Sigma-Aldrich, EUA); 0,4 g/L de L-histidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,4 g/L Uracilo (Sigma Chemical Co., EUA). Desta forma foram complementadas as auxotrofias da estirpe utilizada nestes ensaios (Teixeira *et al.*, 2005).

A solução de a.a. foi preparada em dH₂O, o pH ajustado para 4 e esta posteriormente esterilizada por filtração com filtros de 0,2 µm (Whatman® Schleider & Schuell, EUA). A solução de a.a. foi adicionada ao meio MMB4 na proporção 1:20.

Nos ensaios referidos nas secções 3.2.2 e 3.2.5 a levedura *S. cerevisiae* foi crescida em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de MMB4, a partir de um pré-inóculo (secção 2.3.3) de modo a que DO_{600nm} inicial fosse de $0,100 \pm 0,001$. De seguida, a levedura foi incubada a 30 °C numa incubadora com agitação orbital a 150 rpm (Modelo G25, New Brunswick Scientific Co. Inc., EUA).

Nos ensaios referidos na secção 3.2.3. a levedura foi crescida em condições idênticas de temperatura e agitação em Erlenmeyer de 100 mL com 30 mL de MMB4 suplementado com a solução de a.a. (secção 2.3.2)

2.3.3. Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo de levedura *S. cerevisiae* foi preparado por incubação de células provenientes de cultura fresca mantida em meio YPD como descrito na secção 2.3.1. As células foram incubadas a 30°C com agitação constante a 150rpm até atingir uma DO_{600nm} = $1,00 \pm 0,1$. A medição da DO foi efectuada diluindo uma amostra de células de levedura do pré-inóculo em dH₂O numa proporção de 1:10 (Volume total 1 mL).

2.3.4. Determinação da concentração mínima inibitória de um composto

A determinação da CMI para os compostos em estudo foi realizada através do método de diluição em meio líquido usando microplacas de 96 poços (TPP, Suíça) com meio MMB4 suplementado com a.a. (secção 2.3.2.). Determinou-se uma concentração máxima inicial a testar (Tabela 2.1). Para a Doxorrubicina teve-se como referência a concentração descrita por Schenk P. *et al.* em 2003. Para os compostos TS199 e CoMeOH a concentração máxima inicial foi determinada por tentativa erro.

Tabela 2.1: Concentração máxima inicial dos compostos testados para a determinação das CMI.

Compostos	Concentração máxima inicial (µM)
Doxorrubicina	413,80 (Schenk <i>et al.</i> , 2003)
TS199	2181,65
CoMeOH	4043,60

A diluição dos compostos na placa de 96 poços adoptou sempre o mesmo protocolo experimental (Figura 2.1).

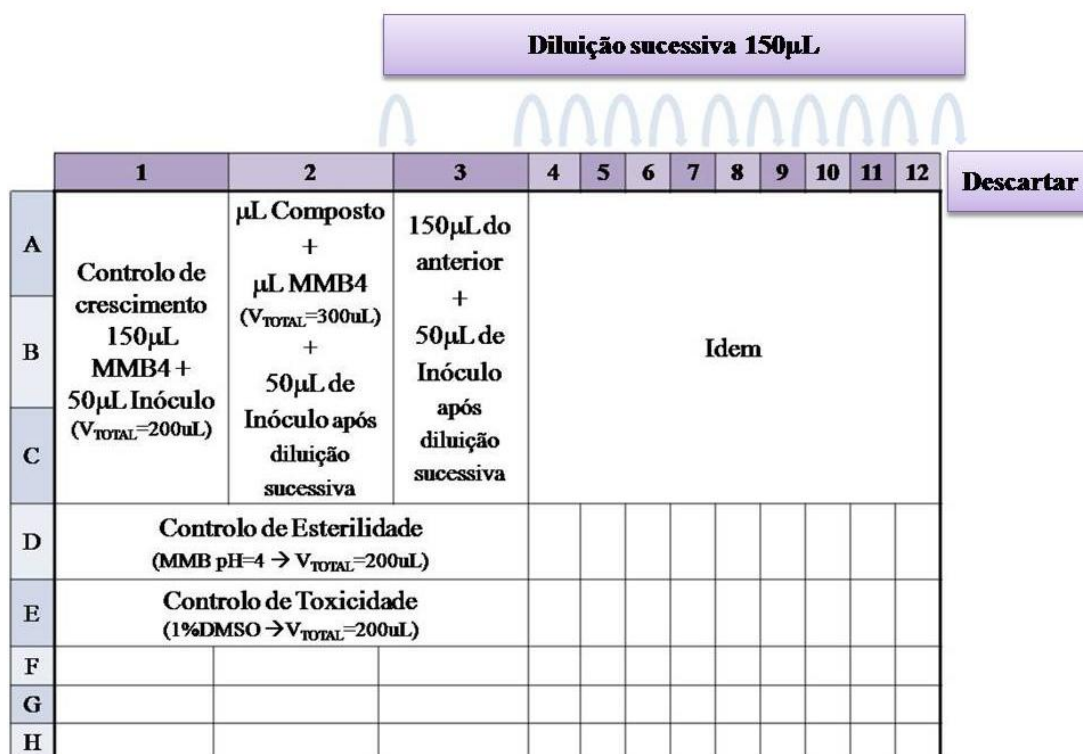


Figura 2.1: Exemplificação da elaboração de uma placa de 96 poços para execução das CMI.

Adicionaram-se 200 µL de MMB4 em triplicado nos poços 1 a 3 da linha D (controlo de esterilidade). Adicionaram-se 150 µL de MMB4 e posteriormente inocularam-se com 50 µL da suspensão de levedura *S. cerevisiae* BY4741 com $DO_{600nm} = 0,500 \pm 0,01$ nos poços da coluna 1 (controlo de crescimento). De seguida, adicionaram-se 150 µL de meio MMB4 nos poços das colunas de 3 a 12. Nos poços da coluna 2 adicionou-se o composto diluído em MMB4 na concentração máxima a ser testada para um volume final de 300 µL. Retiraram-se 150 µL com uma micropipeta multi-canal (Gilson Pipetman®, EUA) e adicionaram-se no poço 3. Homogeneizou-se e retiraram-se 150 µL com a micropipeta multi-canal e adicionou ao poço 4. Repetiu-se este procedimento de diluições seriadas até ao poço 12 e descartou-se o volume após a última diluição de modo a que todos os poços apresentassem o mesmo volume final. Cada poço foi posteriormente inoculado com 50 µL de levedura, com excepção dos poços relativos aos controlos de esterilidade (apenas contendo meio) e ao controlo de crescimento (previamente inoculado).

Utilizou-se um controlo de toxicidade para o solvente DMSO em todos os ensaios com o composto Doxorrubicina, ou seja, adicionou-se uma linha à placa ocupando 3 poços com 150 µL de MMB4 suplementados com 1% de DMSO e 50 µL de inóculo de levedura *S. cerevisiae* BY4741 com $DO_{600nm} = 0,500 \pm 0,01$. Incubou-se a microplaca a 30 °C *overnight*.

Após este período de incubação inspeccionaram-se visualmente os poços da microplaca e registaram-se os resultados obtidos nos poços teste comparando a turbidez (indicativo de crescimento) com o controlo de crescimento (crescimento bacteriano máximo), o controlo de esterilidade (ausência de crescimento) e o controlo de toxicidade (ausência de crescimento).

Determinou-se como CMI o valor correspondente à concentração mínima de composto onde não se observou crescimento visível da levedura. Todos estes ensaios foram efectuados em triplicados.

2.3.5. Crescimento na presença de um composto

A preparação do crescimento da levedura em presença dos compostos foi realizada nas condições descritas na secção 2.3.2. e sempre na presença de $\frac{1}{2}$ da CMI do composto (Tabela 2.2) para assegurar que o composto não apresentava nenhum efeito inibitório no crescimento da levedura.

No caso da Doxorrubicina e uma vez que o solvente utilizado foi o DMSO, fez-se um crescimento controlo negativo com DMSO na mesma proporção para certificar que o solvente não influenciou o crescimento da levedura na presença do mesmo. Os ensaios referidos foram efectuados em triplicados.

Tabela 2.2: Concentração de $\frac{1}{2}$ CMI para cada composto utilizado no crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

Compostos	Concentração de $\frac{1}{2}$ CMI (μM)
Doxorrubicina	25,86
TS199	545,41
CoMeOH	505,45

2.3.6. Caracterização do crescimento celular

2.3.6.1. Medição da densidade óptica das culturas

O crescimento celular foi seguido retirando amostras da suspensão de levedura em crescimento nas condições descritas na secção 2.3.2. Assim, em intervalos de tempo adequados, acompanhou-se o crescimento da levedura através da medição espectrofotométrica das DO das culturas (Hitachi U-1500, Japão). Quando atingindo a $DO_{600\text{nm}} = 0,700 \pm 0,01$, a medição da mesma foi efectuada diluindo uma amostra de células de levedura em dH_2O numa proporção de 1:10 (Volume total 1 mL) (3 ensaios independentes).

2.3.6.2. Cálculo da taxa específica de crescimento

A taxa específica máxima de crescimento foi calculada, para cada uma das condições testadas, por análise de regressão linear na zona linear da representação semi-logarítmica da $DO_{600\text{nm}}$ em função do tempo, com base na seguinte equação:

$$\ln DO_t = \ln DO_0 + \mu_c * t$$

, onde DO_t e DO_0 representam a densidade óptica da suspensão celular, medida a 600 nm respectivamente no tempo t (em h) e no início da fase exponencial de crescimento; μ_c é a taxa específica máxima de crescimento (em h^{-1}) (Fernandes, 1999; Lopes e Fonseca, 1996).

2.3.6.3. Cálculo do tempo de duplicação

O tempo de duplicação (t_d) é a medida de tempo que uma dada população leva a duplicar. O tempo de duplicação relaciona-se com a taxa específica máxima através da fórmula:

$$t_d = \ln(2) \div \mu_c$$

, onde t_d é o tempo de duplicação (em h) e μ_c é a taxa específica máxima de crescimento (em h⁻¹) (Ferreira e Sousa, 1998).

2.3.6.4. Biomassa máxima

A biomassa máxima foi determinada após análise das curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* estirpe BY4741 quando sujeita a cada condição (controlo negativo, ½ CMI Doxorrubicina, ½ CMI TS199 e ½ CMI CoMeOH). A biomassa máxima representa o valor máximo de DO_{600nm} que foi alcançado na fase estacionária de crescimento.

2.3.7. **Testes de viabilidade celular**

Os testes de viabilidade celular efectuados para cada condição testada (controlo negativo, ½ CMI Doxorrubicina, ½ CMI TS199 e ½ CMI CoMeOH) e apresentados na secção 3.2.3. foram preparados como descrito nas secções 2.3.2 e 2.3.5.

Neste teste foram retiradas amostras em intervalos de tempo t (em h) regulares. Cada amostra foi diluída de 1:10 até uma diluição de 10⁻⁶. De seguida, plaquearam-se 100 µL das diluições 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ em placas YPD (secção 2.3.1) (método por espalhamento) e incubaram-se as placas durante 48h a 30°C.

Após o tempo de incubação, contou-se o, número de unidades formadoras de colónias (UFC) por placa para cada tempo, considerando válidas as contagens que se encontravam entre 30 e 300 colónias (Madigan e Martinko, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Por fim, calculou-se o número de UFC por mL para cada tempo e condição testada segundo a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{Média} (N * f_d) * 10$$

, onde N é o número de colónias contadas numa diluição, f_d o factor de diluição da contagem e 10 corresponde ao volume plaqueado (Madigan e Martinko, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Para comparar as diversas condições os dados foram tratados com uma regressão linear que representa as UFC/mL em função do tempo t (em h).

2.3.8. **Avaliação das espécies reactivas de oxigénio**

Para proceder à avaliação das ROS dos compostos Doxorrubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH a ½ CMI, ou seja, 25,86 µM, 545,41 µM e 505,45 µM respectivamente, utilizou-se o Kit *Molecular Probes® for ROS detection: 5-(and-6)-Chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein*

diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) (Invitrogen, EUA) adequado à técnica de microscopia de fluorescência.

Este kit utiliza derivados de fluoresceína e calceína reduzidos como indicadores de ROS. Quimicamente, a forma reduzida e acetilada do 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) e calceína não é fluorescentes até o grupo acetato ser removido por esterase e oxidações intracelulares.

Este protocolo foi efectuado a partir de um pré-inóculo de levedura *S. cerevisiae* BY4741 numa $DO_{600nm} = 0,700 \pm 0,01$. Prepararam-se as amostras, controlo negativo (só levedura), Doxorrubicina (levedura com Doxorrubicina), TS199 (levedura com TS199) e CoMeOH (levedura com CoMeOH) em Erlenmeyer de 20 mL com MMB4 e incubaram-se durante 2 h a 37 °C com agitação orbital de 150 rpm. Seguidamente, preparam-se *Eppendorf* de 1,5 mL com 500 uL das amostras anteriormente incubadas. Preparou-se também, um controlo positivo para ROS a partir do controlo negativo crescido em Erlenmeyer, adicionando-lhe 0,03% de Peróxido de Hidrogénio (Sigma, EUA).

A cada *Eppendorf*, controlo negativo, controlo positivo para ROS, Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH, foram adicionados 20 uL de solução de *Molecular Probes® for ROS detection: 5-(and-6)-Chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)* (Invitrogen). Incubaram-se as amostras 2 h a 37 °C com agitação orbital a 150 rpm.

Após às 2h de incubação, centrifugaram-se as amostras durante 5 min a 5000 rpm, e ressuspenderam-se os *pellets* em 25 µL de tampão MES 25 mM (Sigma, EUA). Prepararam-se lâminas de observação microscópica previamente lavadas com etanol para cada amostra. Imobilizaram-se as células depositadas na lâmina com 20 µL de *Poly-L-Lysine* 0,01% (Sigma, EUA).

Por fim, observaram-se as células de cada amostra em campo claro e de fluorescência utilizando o microscópio de fluorescência na ampliação de 400X. Registaram-se os resultados através do programa *analySIS® Soft Imaging System* (v3.2.). Os ensaios foram realizados em triplicado para todas as condições.

2.3.9. Extracção proteica

As amostras de levedura *S. cerevisiae* BY4741 foram recolhidas e sujeitas a um processo de extracção proteica. Este procedimento foi executado com o objectivo de purificar as proteínas da levedura utilizadas nos estudos funcionais e estruturais do proteoma da levedura nas diferentes condições testadas (controlo negativo, ½ CMI Doxorrubicina, ½ CMI TS199 e ½ CMI CoMeOH).

Neste protocolo lisaram-se as células da levedura usando um processo de abrasão química e mecânica que permite a ruptura das membranas e organelos resultando na libertação e extracção de todas as proteínas solúveis.

A partir de um crescimento da levedura *S. cerevisiae* BY4741, recolheram-se as células por centrifugação a 5000 rpm, durante 5 min e a 4 °C. De seguida, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL de tampão de lise (9 M ureia (Scharlau Chemie, Espanha)

previamente filtrada com um filtro de 0,2 µm, 4% (p/v) 3-[3-(cholomidopropyl)-dimethyl-ammonia]-1-propanesulphanate (CHAPS) (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., EUA), 0,5% (v/v) tampão farmalito pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia), vestígios de azul de bromofenol (Riedel-de-Haën, Alemanha) 40 µL de ditioneitol (DTT) a 15 mM (Promega Corp., EUA), 20 µL fluoreto de metilmetanosulfonil (PMSF; do inglês: *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*) (Termocientific, EUA) 1 mM e 43 µL de inibidores de protease (Complete ULTRA tablets, Roche Applied Science, Alemanha). Adicionou-se igual volume de esferas de vidro de 425-600 µm (Sigma-Aldrich, EUA) e procedeu-se a um ciclo de 1 minuto no gelo, 1 minuto com agitação no vortex (REAX2000 Heidolph, Alemanha), durante 30 minutos. O passo seguinte consistiu em centrifugar as amostras a 5000 rpm durante 20 minutos, a 4°C para separar o extracto proteico do resto das células e das esferas de vidro. Por fim, recuperou-se o sobrenadante para um *Eppendorf* estéril e desprezou-se o restante. As amostras foram conservada a 4°C quando utilizada nas 24h seguintes ou congelada a -80°C (Polar 110H Biomedical Division, Itália) no caso de armazenamento por períodos de tempo mais prolongados (Teixeira *et al.*, 2005).

2.3.10. Precipitação proteica por TCA-DOC

A precipitação proteica foi efectuada a partir do extracto obtido na secção 2.3.9 para cada amostra. Esta técnica permite concentrar e eliminar contaminantes do extracto antes de este ser quantificado (<http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/ProteinPrecipitation.html> acedido a 09/08/2010).

A cada mL de extracto foi adicionado 10 µL de desoxicolato de sódio (DOC) 2% (Merck, Alemanha) e levou-se ao vórtex, deixou-se actuar durante 30 minutos a 4°C. De seguida, adicionaram-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100% (Panreac, Espanha), levou-se ao vórtex e deixou-se actuar *overnight*.

No dia seguinte, centrifugaram-se as amostras a 10000 rpm durante 10 minutos, removeram-se os sobrenadantes e dissolveram-se os *pellets* em 140 µL de tampão de rehidratação (8 M ureia, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (v/v) tampão farmalito pH 3-10, vestígios de azul de bromofenol), 4 µL DTT 15 mM, 2 µL PMSF a 1 mM e 4,3 µL de inibidores de protease (Teixeira *et al.*, 2005). As amostras foram conservadas a 4°C quando utilizada imediatamente ou congeladas a -80°C para armazenamentos mais prolongado (<http://www.biochem.uwo.ca>, acedido a 09/08/2010).

2.3.11. Quantificação de extracto

2.3.11.1. Método de Lowry modificado

Para executar este protocolo utilizaram-se as amostras extraídas e precipitadas como descrito nas secções 2.3.9. e 2.3.10.

Prepararam-se os reagentes de Lowry A, B e C da seguinte forma:

Lowry A: 20,0 g/L de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Panreac, Espanha); 4,0 g/L de hidróxido de sódio (NaOH) (Scharlau, Espanha); 1,6 g/L de tartarato de sódio ($\text{NaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba Reagenti, Itália) e 10,0 g/L de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Riedel-deHaën, Alemanha). Dissolveram-se todos os componentes em 1L de dH_2O pré-aquecida a 37°C .

Lowry B: 2,0 g/L de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha). Dissolveu-se em 50 mL de dH_2O .

Lowry C: preparou-se esta solução com a proporção 1 Lowry B : 100 Lowry A.

Seguidamente, preparou-se a solução stock de Albumina Sérica Bovina (BSA, do inglês: *Bovine Serum Albumine*; Merck, Alemanha) para a elaboração da recta de calibração, utilizando-se para tal uma solução stock com concentração de 0,5 mg/mL. Preparou-se também o tampão tris-HCL (Calbiochem, EUA) 20 mM com pH 7,5, TCA a 10%, e na altura dos ensaios experimentais adicionou-se DOC a 1%.

Tabela 2.3: Ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Lowry modificado.

	Tubo	BSA (μg)	Amostra (μL)	Tris-HCl 20mM, pH 7,5 (μL)
Solução stock de BSA 0,5 mg/mL	0	0	0	250
	1	2,5	5	245
	2	5	10	240
	3	10	20	230
	4	15	30	220
	5	25	50	200
	6	35	70	180
	Amostra extraída	-----	5	245

Todas as amostras foram efectuadas em triplicado. De seguida, prefiz-se o volume final da amostras para 500 μL com dH_2O . Adicionaram-se 50 μL de DOC a 1% e de seguida adicionou-se 1 mL de TCA a 10%. Agitaram-se as amostras e aguardou-se 10 minutos. Centrifugaram-se as amostras durante 5 minutos a 10000 rpm e descartaram-se os sobrenadantes. Deixaram-se secar os *pellets*, invertendo os tubos num papel absorvente durante mais de 15 minutos. De seguida, adicionou-se 1 mL de reagente C e dissolveram-se os *pellets* com a ajuda do vórtex. Esperou-se 10 minutos e adicionaram-se 100 μL de reagente de Folin (Ciocalteu Merck, Alemanha) diluído 1:1. Agitaram-se as amostras e aguardou-se 30 minutos no escuro. Por fim, mediram-se as absorvâncias a 750 nm contra o branco (dH_2O). Os dados foram tratados no Excel para determinar a quantidade de proteínas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para cada amostra e comparados com a quantificação das mesmas feitas por electroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (*SDS-Page*; do inglês: *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide-gel electrophoresis*) descrito na secção 2.3.11.2. Os resultados aqui obtidos permitiram determinar o volume de amostra a ser tratado com o Kit *2-D Clean-Up* (secção 2.3.12).

2.3.11.2. Quantificação por SDS-Page

A técnica de *SDS-Page* surgiu nos anos 60 e é utilizada rotineiramente para analisar proteínas. Este método permite separar todo o tipo de proteínas inclusivamente proteínas insolúveis em água. Neste processo os polipeptídeos são separados por tamanho possibilitando a obtenção de informações acerca do peso molecular e das subunidades dos complexos proteicos (Alberts et al., 2002; Berg et al., 2007).

A *SDS-Page* baseia-se no uso do detergente SDS que possui uma potente carga negativa e que se liga às regiões hidrofóbicas das moléculas proteicas permitindo a migração das mesmas ao longo de uma matriz inerte de poliacrilamida que constitui o gel (Alberts *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2007).

Para realizar este ensaio utilizou-se um sistema *SDS-PAGE Mini-PROTEAN® 3 System* (Bio-Rad Laboratories, inc., EUA) e prepararam-se diversas soluções, nomeadamente:

Tampão de aplicação 4x: 5,0 mL de tampão tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 4,4 mL de glicerol (Panreac, Espanha); 8,0 mL de SDS 10%; vestígios de azul de bromofenol e 2,6 mL de dH₂O. No momento do ensaio adicionou-se DTT a 10%.

Tampão de electroforese 4x: 15,15 g/L de tris base (Calbiochem, EUA); 72,0 g/L de glicina (Panreac, Espanha) e 5,0 g/L de SDS (Teixeira *et al.*, 2005).

Gel de Resolução: 4,0 mL de acrilbis a 30% (Merck, Alemanha); 2,5 mL de tampão tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e 3,5 mL de dH₂O. Na altura da realização do protocolo experimental adicionaram-se 75 µL de Persulfato de Amónia a 10% (APS) (Bio-Rad Laboratories inc., EUA) e 10 µL de N,N,N,N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, EUA) (Teixeira *et al.*, 2005).

Gel de Concentração: 0,616 mL de acrilbis 30%; 1,25 mL de tampão tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e 3,134 mL de dH₂O. No momento do ensaio adicionaram-se 50 µL de APS e 5µL de TEMED.

Aplicaram-se as amostras no gel (amostra e tampão de aplicação) e ligou-se a fonte de tensão a 150 V durante ± 1 hora.

Depois da corrida, corou-se o gel com azul de Coomassie (3 pastilhas de PhasTGel™ Blue R (Coomassie R350) (GE Healthcare BioScience AB) em 1 L de ácido acético (Panreac, Espanha) a 10% (v/v) em dH₂O). Posteriormente, colocou-se o gel corado com Coomassie num recipiente com água e aqueceu-se no micro-ondas durante ± 2 minutos. O gel foi descorado até ocorrer a revelação, ou seja, o aparecimento do padrão de bandas. Por fim, adquiriu-se a imagem do gel descorado através de um scanner; editou-se a imagem com o programa GIMP (versão 2.6.7) e analisou-se o resultado conjuntamente com a quantificação pelo método de Lowry para determinar o volume de amostra de cada condição (controlo negativo, ½ CMI Doxorubicina, ½ CMI TS199 e ½ CMI CoMeOH) a ser tratada na 2.3.12.

2.3.12. **Precipitação proteica pelo Kit 2-D Clean up**

O kit *2-D Clean-Up* (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., EUA) permitiu preparar as amostras extraídas para 2-DE. Este protocolo consiste na precipitação quantitativa das proteínas removendo as

substâncias contaminantes que podem interferir na 2-DE, como: detergentes, sais, lípidos, fenóis e ácidos nucleicos (GE Healthcare, 2009) e facilita a concentração proteica num menor volume.

Este protocolo foi executado depois de os extractos terem sido analisados quantitativamente e qualitativamente como descrito nas secções 2.3.11.1 e 2.3.11.2.

Considerou-se o protocolo descrito para amostras com mais de 100 µg de proteínas, uma vez que se pretendeu colocar 250 a 300 µg de proteínas nas tiras de isofocagem. Nos passos seguintes transferiu-se o volume de amostra de proteínas previamente quantificado para um tubo *Eppendorf*. Adicionou-se três vezes o volume da amostra de solução precipitante e homogeneizou-se com ajuda do vórtex. Incubou-se a amostra em gelo durante 15 minutos. Adicionou-se três vezes o volume inicial de solução co-precipitante e levou-se ao vórtex brevemente. Seguidamente, centrifugou-se a 8000 g durante 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante e centrifugou-se durante 1 minuto. De seguida, removeu-se o sobrenadante com uma micropipeta e adicionou-se três a quatro vezes o volume do *pellet* de co-precipitante. Centrifugou-se durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Pipetou-se dH₂O até ao topo do *pellet* e levou-se ao vórtex até este ressuspender. Adicionou-se 1mL de tampão de lavagem (*wash buffer*) previamente arrefecido (pelo menos 1 hora a -20°C) e adicionaram-se 5 µL de aditivo de lavagem (*wash additive*). Levou-se a amostra ao vórtex até o *pellet* dissolver na totalidade. Incubou-se a amostra a -20°C durante 30 minutos, levando-se ao vórtex de 10 em 10 minutos durante 20-30 segundos. Centrifugou-se durante 10 minutos a 8000 g; descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar ao ar não excedendo os 5 minutos. Ressupendeu-se no tampão de re-hidratação adequado a 2-DE composto por 115 µL de tampão de re-hidratação (8 M ureia, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (v/v), tampão farmalito pH 3-10, vestígios de azul de bromofenol, 4 µL de DTT a 15 mM, 2 µL de PMSF a 1 mM e 4,3 µL de inibidores de protease. O sobrenadante foi utilizado directamente na isofocagem de primeira dimensão da 2-DE (secção 2.3.13.1.) ou armazenado num tubo *Eppendorf* a -80°C.

2.3.13. Proteómica

Determinou-se como intervalo de quantidade de proteína das amostras os valores de 250-300 µg de proteínas de modo a comparar os diferentes géis de 2-DE obtidos.

2.3.13.1. Primeira dimensão

Para cada amostra extraída (secção 2.3.9), quantificada (secção 2.3.11) e concentrada (secção 2.3.12) antes de efectuar a primeira dimensão da 2-DE, incubou-se a amostra 2h à temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra 15 minutos a 15000 rpm e a 4 °C e por fim, transferiu-se o sobrenadante para um tubo *Eppendorf* estéril.

O sobrenadante recolhido anteriormente foi transferido na sua totalidade para o suporte das tiras de isofocagem – designado de sarcófago. De seguida, colocou-se a tira de isofocagem *Immobiline™ DryStrip pH3-10NL, 7cm* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) por cima da amostra tendo-se retirado previamente a película protectora da tira. Colocaram-se 2 mL de óleo mineral

PlusOne DryStrip Cover Fluid (Amersham Biosciences AB, Suécia) e fechou-se o sarcófago. Colocou-se o sarcófago na placa da plataforma Ettan™ IPGPhor™3IEF (GE Healthcare UK Limited, Reino Unido) e correu-se o programa apresentado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Programa de primeira dimensão executado na plataforma Ettan™ IPGPhor™3IEF (GE Healthcare UK Limited, Reino Unido) nas amostras tratadas neste estudo.

Passos	Corrente eléctrica (V)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	30	12,0	20,0
2	100	0,5	20,0
3	500	0,5	20,0
4	1000	0,5	20,0
5	5000	1,0	20,0

Caso as tiras não fossem tratadas imediatamente após a primeira dimensão, eram conservadas a -80 °C.

Para cada condição (controlo negativo, ½ CMI Doxorrubicina, ½ CMI TS199 e ½ CMI CoMeOH) o ensaio foi realizado em triplicado.

2.3.13.2. Segunda Dimensão

Depois de efectuado o protocolo descrito na secção 2.3.13.1 efectuou-se a segunda dimensão da 2-DE utilizando-se as tiras isofocadas e o sistema *SDS-PAGE Mini-PROTEAN® 3 System*. Procedeu-se ao equilíbrio das tiras mergulhando-as em 10 mL de solução de equilíbrio composta por 50 mL de tampão tris-HCl a 1,5 M, pH 8,8; 360,35 g/L de ureia 6 M; 20 g/L de SDS; 354 mL de glicerol e vestígios de azul de bromofenol.

O equilíbrio das tiras foi realizado em dois passos de 15 minutos com agitação, nomeadamente um primeiro equilíbrio com 1% de DTT e um segundo com 2,5% de iodocetamida (GE Healthcare UK Limited, Reino Unido).

O passo seguinte consistiu em correr um gel de poliacrilamida a partir das tiras isofocadas e equilibradas. O gel de corrida é composto por um gel de resolução (secção 2.3.11.2.) e uma solução de agarose de 0,5% (10 mL de tampão de electroforese 1x, 0,5% de agarose (p/v) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) e vestígios de azul de bromofenol.

Depois do gel de resolução ter polimerizado aplicou-se a tira isofocada no seu topo e selou-se o gel com a solução de agarose. Aplicaram-se os vidros do sistema de *SDS-Page* na tina de electroforese, preencheu-se com tampão de electroforese e por fim, ligou-se o módulo de tensão numa primeira fase (± 30 minutos) a 30 V e numa fase posterior a 100V ($\pm 2,5$ h).

Quando se observou a saída da cor para o tampão de electroforese considerou-se por concluída a corrida da segunda dimensão da 2-DE. Seguidamente, removeu-se o gel para um recipiente e realizou-se a coloração com azul de Coomassie (3 pastilhas de PhasTGel™ Blue R (Coomassie R350) em 1 L de ácido acético a 10% (v/v) em dH₂O) no micro-ondas durante ± 2 minutos. De seguida, o gel

foi descorado com água quente até ocorrer a revelação do gel, ou seja, o aparecimento dos *spots*, isto é, das isoformas proteicas. Finalmente, adquiriu-se a imagem do gel de proteómica através de um scanner e editou-se a imagem com o programa GIMP (versão 2.6.7.)

Para cada condição (controlo negativo, $\frac{1}{2}$ CMI Doxorubicina, $\frac{1}{2}$ CMI TS199 e $\frac{1}{2}$ CMI CoMeOH) este ensaio foi realizado em triplicado.

2.3.13.3. Identificação de proteínas

Depois de analisar e comparar os géis entre si (secção 2.3.13.2), excisaram-se os *spots* de interesse; colocou-se cada *spot* num poço numerado de uma placa de 96 poços e congelou-se a -80°C .

Numa primeira fase desta dissertação, as amostras (*spot* excisado na placa de 96 poços) foram enviadas numa caixa em gel seco para o *Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser* da Universidade Paul Verlaine em Metz, França, ao grupo coordenado pelo Doutor Patrick Chaimbault e ao aluno de Doutoramento David da Silva para serem identificadas as isoformas proteicas e numa segunda fase, a identificação foi feita no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em cooperação com a Doutora Tânia Simões. Em ambos os locais, utilizaram a técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* (FMF) / *Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (MALDI-FT-ICR-MS).

2.3.13.4. Análise dos géis

As imagens dos géis foram analisadas no programa *Progenesis SameSpots* (Nonlinear Dynamics Limited, Reino Unido) <http://www.nonlinear.com/productsemprogenisissame-spotsemoverview/> para avaliar a expressão da cada isoforma proteica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Linhas celulares

Para averiguar a acção citostática dos complexos de escorpionato, avaliou-se a percentagem de citotoxicidade em linhas tumorais através do ensaio de MTS. Este método, que determina a viabilidade celular da amostra (equação descrita na secção 2.2.5), foi utilizado pois possibilita a detecção por leitura directa de DO a 490nm da redução de formazano solúvel, formado a partir do sal de tetrazólio metabolizado pelas desidrogenases de células activas (Hong *et al.*, 2003; Promega, 2009).

Recorrendo-se ao método de coloração de Hoechst apurou-se a via de morte celular empregue pelas células. Este método utiliza um corante fluorescente lipofílico permeável às células, que cora os seus núcleos, permitindo a sua avaliação (Borrvalho *et al.*, 2009; Kiechle e Zhang, 2002).

Como referido por diversos autores, o composto Doxorrubicina é um composto com acção anti-tumoral contra tumores sólidos e hematológicos. Sabe-se ainda que nas células cancerígenas, um dos mecanismos de citotoxicidade deste composto é a indução de morte celular por apoptose (Hammer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Westmoreland *et al.*, 2009). Assim sendo, este composto foi utilizado como controlo positivo nos ensaios de MTS e Hoechst para poder comparar o seu efeito citotóxico e indução de apoptose com os resultados obtidos para os complexos de escorpionato.

Tal como referido na secção 2.2.4, os ensaios de MTS para o composto Doxorrubicina foram realizados em células HCT116 na ausência e presença de diferentes concentrações de composto, nomeadamente 0,1, 1, 10, 125, 250 e 500 μM sujeitando as células aos seguintes parâmetros: 37°C, 5% CO_2 , 48h de incubação com composto.

O controlo negativo (células HCT116) dos ensaios de Doxorrubicina foi efectuado na presença do solvente do composto nomeadamente, DMSO.

Os resultados obtidos para estes ensaios estão representados na Figura 3.1.

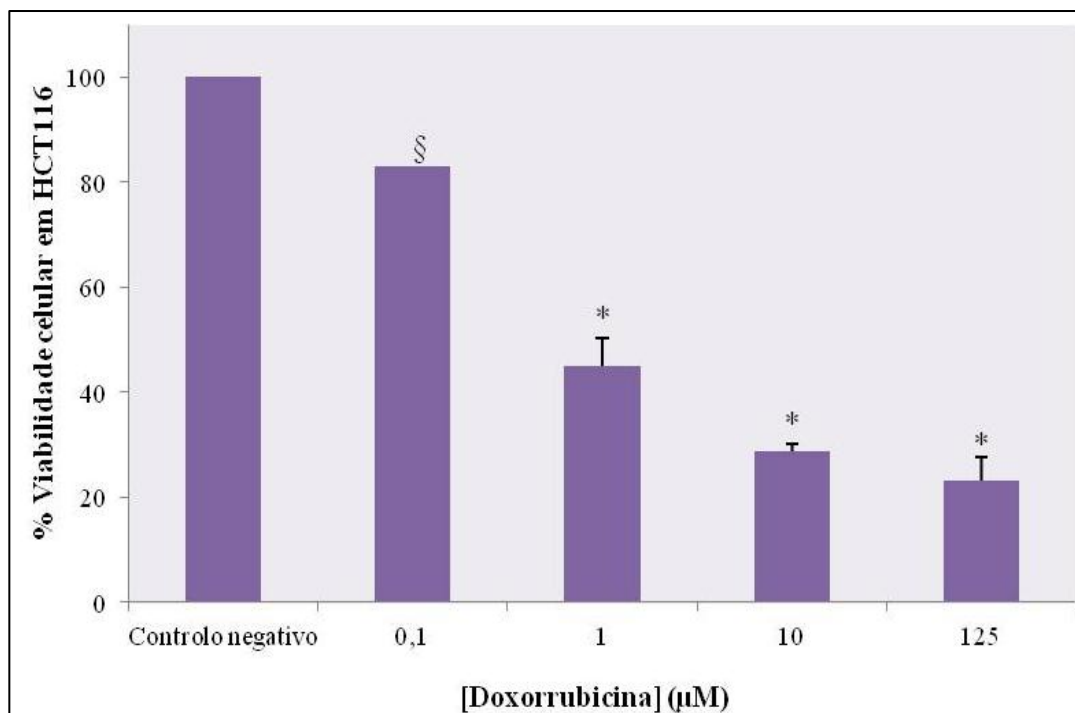


Figura 3.1: Representação gráfica de viabilidade celular da linha tumoral HCT116 avaliada pelo ensaio de MTS na ausência e na presença do composto Doxorubicina. Os resultados são expressos com as médias \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes. § $p < 0.05$ and * $p < 0.001$ comparando com o controlo negativo.

Na Figura 3.1 é possível verificar que a percentagem de viabilidade celular decresce com o aumento da concentração do composto. Para as concentrações de 0,1, 1, 10 e 125 μM as percentagens de citotoxicidade foram de 17,1%, 52,1%, 71,1% e 76,7 %, respectivamente. Para as concentrações de 250 e 500 μM , os resultados obtidos foram inconclusivos uma vez que a cor deste composto nestas concentrações interfere com a leitura de absorvância do ensaio MTS. Relativamente ao controlo negativo com DMSO ($< 0,3\%$), observou-se 0% de citotoxicidade, inferindo-se que o solvente não interfere com os resultados obtidos na citotoxicidade do composto Doxorubicina.

Para validar estatisticamente os resultados destes ensaios efectuou-se um teste-t Student, no qual se considerou que as amostras são normalizadas e homogéneas. Os valores de p value foram estatisticamente significativos por comparação com o controlo negativo, uma vez que foram inferiores a: $p < 0,05$ para 0,1 μM de Doxorubicina e $p < 0,001$ para as restantes concentrações avaliadas.

Os resultados representados na Figura 3.1 permitiram concluir que, o composto Doxorubicina induz citotoxicidade nas células HCT116.

Efectuou-se novo teste-t Student para comparar as citotoxicidades obtidas entre as diferentes concentrações testadas. Verificou-se que o valor de p value deixa de ser significativo ($p > 0,05$) comparando as concentrações de 1 μM versus 10 μM e 10 μM versus 125 μM . Estes resultados permitem inferir que a concentração de composto Doxorubicina, que induz citotoxicidade significativamente nas células HCT116, deve ser aproximadamente de 10 μM de composto.

Nas linhas HepG2 não foram efectuados ensaios de MTS para o composto Doxorrubicina, visto já terem sido realizados por outros autores ensaios de citotoxicidade nesta linha tumoral. Sendo assim, consideraram-se os resultados publicados, no qual verificaram a indução de citotoxicidade (2%, 13%, 20% para 0,1, 1 e 10 μM , respectivamente) para esta linha tumoral (Hammer *et al.*, 2009).

Tal como referido na secção 2.2.4, os ensaios de MTS para os compostos TS199 e CoMeOH foram realizados em células HCT116 e HepG2 na ausência e presença de diferentes concentrações de composto, sujeitando as células a condições idênticas aos ensaios MTS com o composto Doxorrubicina.

O controlo negativo dos ensaios MTS com os complexos TS199 e CoMeOH foi efectuado apenas com células HCT116 ou células HepG2 e meio completo, uma vez que o solvente destes compostos foi água.

Os resultados obtidos para os ensaios com o composto TS199 estão representados na Figura 3.2..

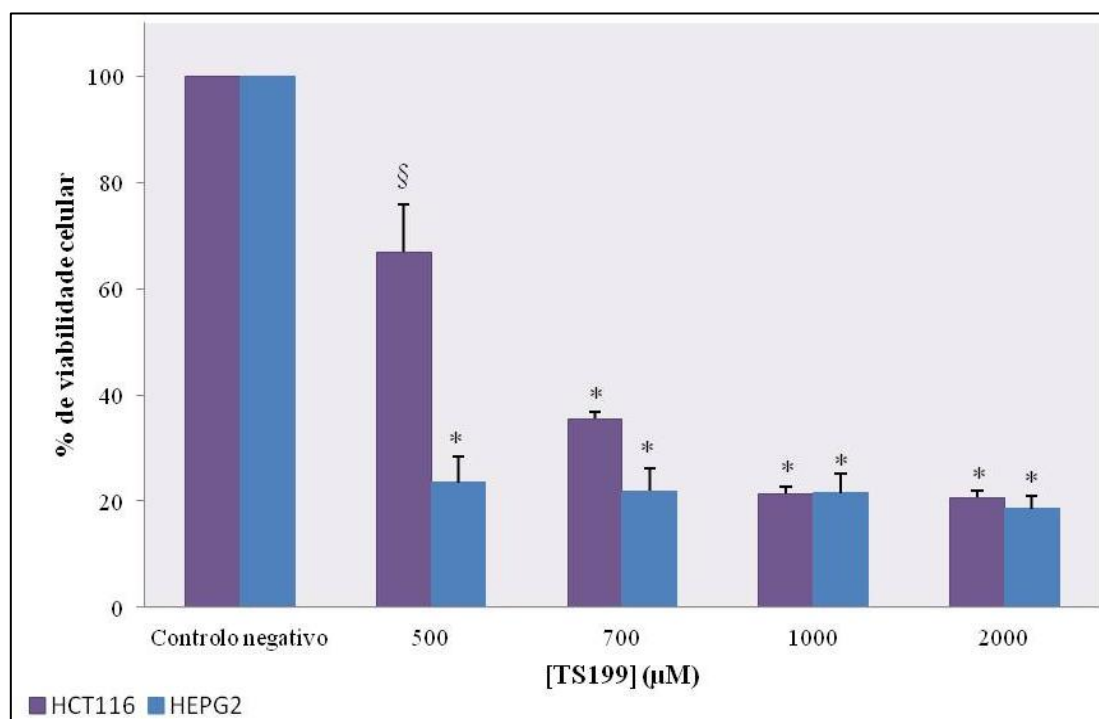


Figura 3.2: Representação gráfica de viabilidade celular de linhas tumorais HCT116 e HepG2 avaliadas pelo ensaio de MTS na ausência e na presença do composto TS199. Os resultados são expressos com as médias \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes. § $p < 0,05$ and * $p < 0,001$ comparando com o controlo negativo.

Os resultados patentes na Figura 3.2 revelam um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração de composto TS199 para as duas linhas tumorais testadas. As percentagens de citotoxicidade foram de 33,1%, 64,5%, 78,6% e 79,4% para a linha tumoral HCT116 e 76,5%, 78,1%, 78,5% e 81,5% para concentrações de 500, 700, 1000 e 2000 μM , respectivamente.

À semelhança dos ensaios MTS com o composto Doxorrubicina, efectuou-se um teste-t Student. Os valores de *p value* obtidos por comparação do controlo negativo também são significativos estatisticamente, dado que os valores foram: $p < 0,05$ para 500 μM de concentração de TS199 e $p < 0,001$ para 700, 1000 e 2000 μM em linhas HCT116 e $p < 0,001$ para todas as concentrações em linhas HepG2.

Pelos resultados obtidos pode concluir-se que o complexo de escorpionato TS199 apresenta citotoxicidade tanto para as células tumorais HCT116 como para as células HepG2. No entanto, é possível constatar que o composto TS199 é mais citotóxico para as células HepG2 ($\approx 77\%$) do que para as células HCT116 ($\approx 33\%$) para uma menor concentração (500 μM) de composto.

Posto isto, tentou-se averiguar qual a concentração de composto que poderia ser considerada estatisticamente significativa, efectuando-se o teste-t Student entre as diferentes concentrações testadas. Verificou-se que, o valor de *p value* deixa de ser significativo ($p > 0,05$) a partir dos 1000 μM em HCT116 e 500 μM em HepG2. Sendo assim, conclui-se que as concentrações de composto TS199 que induzem citotoxicidade nas linhas tumorais são: 1000 μM para as células HCT116 ($\approx 79\%$) e 500 μM em HepG2 ($\approx 77\%$).

Relativamente aos ensaios de MTS com o composto CoMeOH, os resultados obtidos estão representados na Figura 3.3.

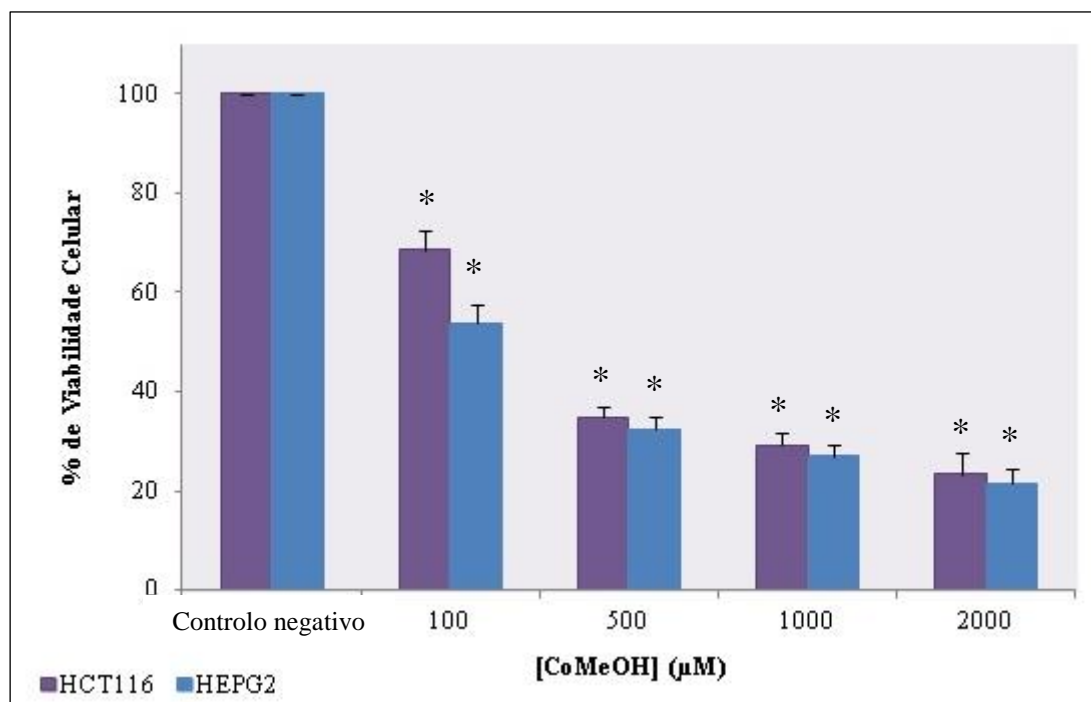


Figura 3.3: Representação gráfica de viabilidade celular de linhas tumorais HCT116 e HepG2 avaliadas pelo ensaio de MTS na ausência e na presença do composto CoMeOH. Os resultados são expressos com as médias \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes. * $p < 0,001$ comparando com o controlo negativo.

Observando os resultados obtidos, à semelhança dos ensaios anteriores, é possível constatar a existência do decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto CoMeOH. Os valores de citotoxicidade para concentrações de CoMeOH de 100, 500, 1000 e 2000 μM para a linha tumoral HCT116 foram de 31,4%, 65,2%, 70,6% e 76,6% e para a HepG2 foram de 46,2%, 67,5%, 73,0% e 78,4%.

À semelhança dos ensaios anteriores, efectuou-se o teste estatístico comparando o controlo negativo com as diferentes concentrações de CoMeOH (100, 500, 1000 e 2000 μM) obtendo-se valores de $p < 0,001$ em ambas as linhas HCT116 e HepG2, concluindo que o composto CoMeOH induz citotoxicidade nas linhas tumorais em estudo.

Tal como nos ensaios anteriores compararam-se as citotoxicidades obtidas e verificou-se que, o valor de p value deixa de ser significativo ($p > 0,05$). Comparando as concentrações de 500 μM *versus* 1000 μM e 1000 μM *versus* 2000 μM em HCT116 e em HepG2. Sendo assim, conclui-se que a concentração de composto CoMeOH que induz citotoxicidade nas linhas tumorais é de 500 μM (\approx 65% (HCT116) e 68% (HepG2)).

Comparando os ensaios de MTS para os compostos TS199 e CoMeOH com o ensaio de MTS para o composto Doxorrubicina (controlo positivo para citotoxicidade), verificou-se que à semelhança deste último os compostos de escorpionato induzem citotoxicidade em linhas tumorais, podendo-se inferir que os complexos de escorpionato testados possuem capacidade citostática. No entanto, comparativamente ao composto Doxorrubicina (10 μM) verificou-se a necessidade de concentrações de composto muito maiores para atingir a mesma citotoxicidade (\approx 70 %) com os compostos TS199 (1000 μM) e CoMeOH (500 μM) em linha HCT116.

Verificou-se ainda que, para as concentrações de 1000 e 2000 μM , nas células HCT116, o composto TS199 (\approx 79%) é mais citotóxico do que o composto CoMeOH (\approx 77%). Em células HepG2 verificou-se também maior citotoxicidade para concentrações de 500, 1000 e 2000 μM para o composto TS199 (\approx 78%, 79%, e 82%, respectivamente). Assim, estes resultados permitem inferir que o composto TS199 é mais citotóxico do que o composto CoMeOH.

Depois de determinada a citotoxicidade dos compostos, averiguou-se a via de morte celular empregue pelas células realizando-se a coloração pelo método de Hoechst, tal como referido na secção 2.2.6. Estes ensaios foram realizados nas células tumorais HCT116, para concentrações de 0,5 μM para a Doxorrubicina; 900 e 1500 μM para o TS199; 250 e 500 μM para CoMeOH. Estas concentrações foram escolhidas porque correspondem à concentração de composto na qual existe citotoxicidade nas células HCT116, que permite a observação de células vivas ao microscópio de fluorescência.

A morte celular dos sistemas biológicos pode ser classificada por necrose e apoptose. A necrose é considerada morte celular accidental. Neste processo, a membrana citoplasmática da célula rebenta e é libertado o conteúdo celular para o meio extracelular, provocando danos nas células vizinhas e assim uma resposta inflamatória no tecido. A apoptose é considerada de morte celular

programada e envolve o consumo de ATP. Este processo envolve alterações morfológicas da célula tais como: condensação nuclear e fragmentação, isolamento de organelos citoplasmáticos em regiões distintas, formação de núcleos apoptóticos, ou seja, de vesículas com conteúdo celular. Estas vesículas são depois engolfadas por macrófagos ou células vizinhas sem promover qualquer resposta inflamatória. Esta via pode ser induzida por diversos estímulos tais como: ligação de receptores celulares de superfícies, privação de soro e de factores de crescimento, choque térmico, hipoxia, exposição a radiação ultravioleta, danos no DNA, infecção viral, exposição a compostos citotóxicos ou agentes quimioterapêuticos (Boujrad *et al.*, 2007; Jaganathan *et al.*, 2010; Langdon, 2003).

Sendo assim, os resultados obtidos pelo método de coloração de Hoechst para os diferentes compostos nas concentrações testadas são apresentados na Figura 3.4.

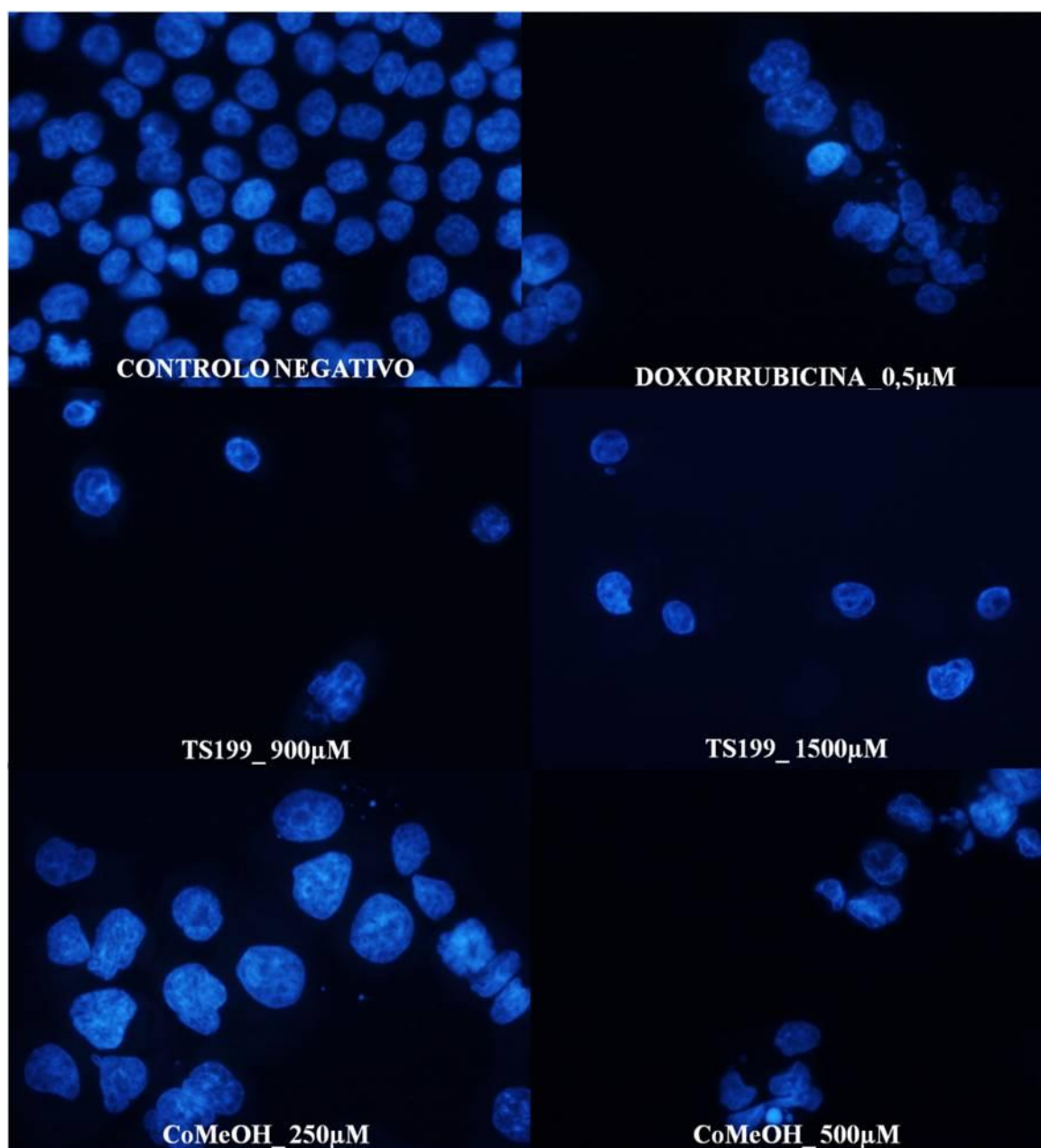


Figura 3.4: Células tumorais HCT116 marcadas pelo método de Hoechst na ausência e na presença dos compostos Doxorubicina, TS199 e CoMeOH. Observação feita por microscopia de fluorescência (400X). Resultados representativos de pelo menos três ensaios independentes.

Na Figura 3.4 em todas as condições, excepto no controlo negativo, observaram-se núcleos apoptóticos. Esta observação permitiu inferir que à semelhança do composto Doxorrubicina, a via de morte celular activada pelos compostos TS199 e CoMeOH é a apoptose. Este facto é importante uma vez que a apoptose, como referido anteriormente, é a via de morte celular que minimiza os danos em células vizinhas, sendo que num indivíduo com cancro, as células circundantes de células cancerígenas podem ser células normais.

Para complementar a informação visual, calcularam-se as percentagens de apoptose para cada condição testada (Figura 3.5). Para tal, fez-se a contagem de células viáveis e células apoptóticas de 5 campos do microscópio (três ensaios independentes).

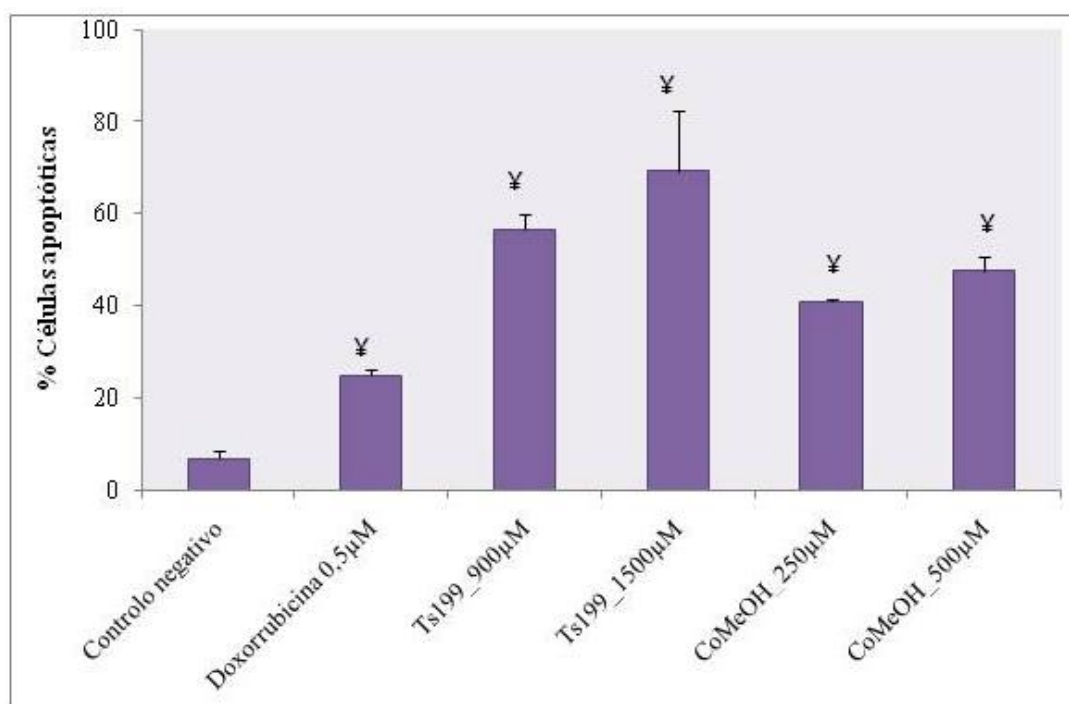


Figura 3.5: Representação gráfica da avaliação de apoptose em células tumorais HCT116 pelo método de marcação de Hoechst. ¥ - $p < 0,01$ comparando com o controlo negativo.

As percentagens de apoptose obtidas foram de 6,8%, 25,4%, 45,8%, 77,8%, 41% e 58% para controlo negativo; 0,5 µM Doxorrubicina; 900 e 1500 µM de TS199 e 250 e 500 µM de CoMeOH, respectivamente.

Neste ensaio efectuou-se o teste-t Student para validar os resultados, obtendo-se valores de $p < 0,01$ para todas as amostras comparando com o controlo negativo, ou seja, inferiu-se que existe apoptose em todas as condições testadas (situação esperada para as células tumorais na presença de Doxorrubicina). Efectuou-se também o teste estatístico para TS199 900 µM *versus* 1500 µM e CoMeOH 250µM *versus* 500 µM, obtendo-se valor de $p > 0,05$, sendo assim o aumento de apoptose não tem uma correlação linear com o aumento de concentração do composto.

3.2. Estirpe BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*

Na segunda parte desta dissertação, caracterizou-se o fenótipo e proteoma do modelo *S. cerevisiae* na presença dos complexos de escorpionato em estudo para elucidar quais os alvos e modos de acção desencadeados. Para tal, caracterizou-se a CMI e a curva de crescimento, determinou-se a viabilidade celular e actividade de ROS e por fim, analisou-se os géis de proteómica obtidos por 2-DE para cada condição testada, seguindo os procedimentos descritos na secção 2.3.

Tal como nos ensaios de linhas tumorais, o composto Doxorrubicina foi utilizado como controlo positivo.

3.2.1. Determinação da concentração mínima inibitória

A CMI quantifica a actividade anti-microbiana de um composto, representando a quantidade mínima de composto necessária para inibir o crescimento de um organismo, neste caso específico da levedura *S. cerevisiae* estirpe BY4741 (Madigan e Martinko, 2006; Prescott *et al.*, 2005).

Para este estudo, preparam-se placas de 96 poços como descrito na secção 2.3.4. Registaram-se os valores obtidos e fez-se a média dos valores obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 3.1 para os compostos Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH.

Tabela 3.1. CMI dos compostos testados.

Compostos	CMI (μM)
Doxorrubicina	$51,73 \pm 0,01$
TS199	$1090,83 \pm 0,01$
CoMeOH	$1010,90 \pm 0,01$

Concluiu-se que para a levedura *S. cerevisiae* os compostos TS199 e CoMeOH apresentam actividade anti-microbiana para valores de CMI muito semelhante, nomeadamente: $1090,83 \mu\text{M}$ (TS199) e $1010,90 \mu\text{M}$ (CoMeOH). Esta observação permite inferir que estes dois compostos poderão ter uma actividade anti-microbiana semelhante. Relativamente à Doxorrubicina, apresenta uma CMI muito inferior (cerca de 22 vezes) aos compostos TS199 e CoMeOH, indicando a sua elevada actividade anti-microbiana.

3.2.2. Caracterização do crescimento celular

Depois de se determinarem os valores de CMI para cada composto (Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH), caracterizaram-se as curvas de crescimento microbiano da levedura na presença de $\frac{1}{2}$ CMI dos compostos. O valor de $\frac{1}{2}$ CMI foi escolhido de modo a obter um efeito inibitório na taxa específica de crescimento da levedura que pudesse ser caracterizado (medianamente inibido). Este protocolo permite obter uma caracterização das fases de latência, exponencial, estacionária e de morte da levedura, na presença dos compostos em estudo.

Inoculou-se a levedura com $\frac{1}{2}$ CMI dos compostos durante aproximadamente 50h e registaram-se as DO_{600nm} em intervalos de tempo regulares, obtendo-se as curvas representadas na Figura 3.6 (3 ensaios independentes).

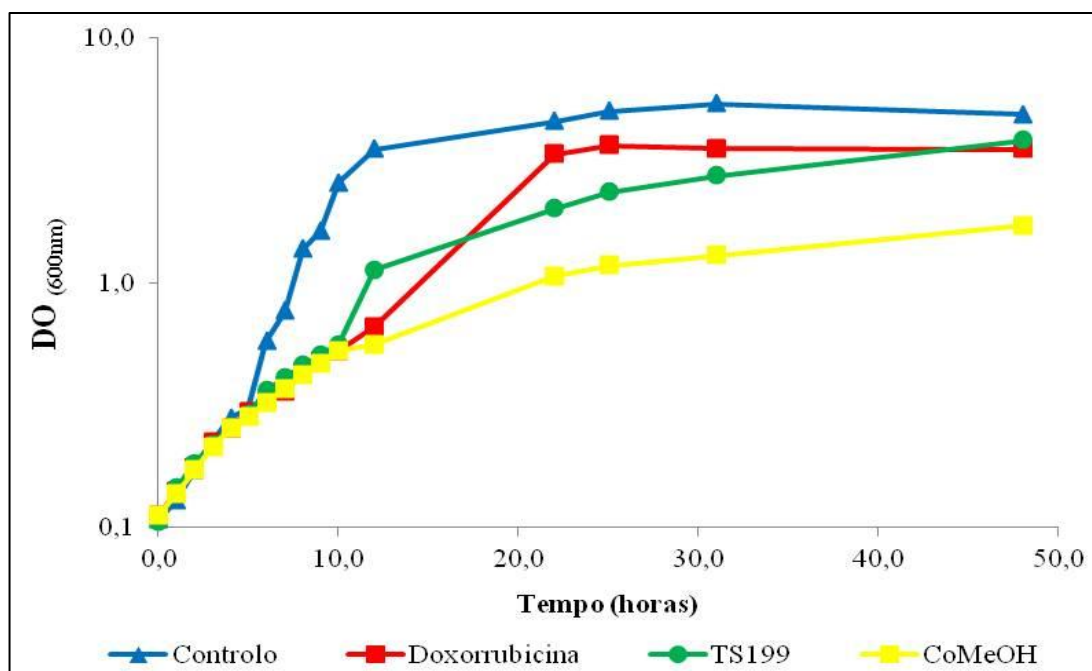


Figura 3.6: Representação gráfica das curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* estirpe BY4741 na ausência de composto (controlo negativo) e presença de Doxorrubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH (compostos teste) a $\frac{1}{2}$ da CMI nas respectivas concentrações $25,86 \mu M \pm 0,01$; $545,41 \mu M \pm 0,01$; $505,45 \mu M \pm 0,01$.

Através destes dados calcularam-se os parâmetros de taxa específica de crescimento (em h^{-1}), tempo de duplicação (em h) e biomassa máxima para cada condição testada (Tabela 3.2)

Tabela 3.2: Caracterização do crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* quando crescida em meio MMB4 na ausência de composto (controlo negativo), na presença de Doxorrubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH (compostos teste). Os valores da tabela são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.

	Controlo	Doxorrubicina	TS199	CoMeOH
Biomassa Máxima	5,360	3,490	3,800	1,700
μ_c (em h^{-1})	0,361	0,137	0,159	0,082
Tempo duplicação (em h)	1,9	5,1	4,4	8,5

Legenda: μ_c - taxa específica de crescimento.

A taxa específica de crescimento exprime o aumento da população por unidade de tempo e por unidade de população; o tempo de duplicação é o tempo que leva uma população microbiana a duplicar o seu número celular e a biomassa máxima corresponde a DO_{600nm} máxima lida durante o

crescimento microbiano na fase estacionária do crescimento (Ferreira e Sousa, 1998; Lopes e Fonseca, 1996; Madigan e Martinko, 2006).

Pela análise dos resultados obtidos é possível inferir que para a amostra controlo negativo obteve-se um resultado coerente com a literatura para o tempo de duplicação uma vez que o valor obtido foi de 1,9h, estando este valor descrito na literatura como sendo de 2,0h (Prescott *et al.*, 2005). Comparando às restantes condições testadas, o controlo possui a biomassa máxima (5,360) e a taxa específica de crescimento ($0,361\text{h}^{-1}$) mais elevada.

Relativamente aos compostos Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH os tempos de duplicação são de 5,1h, 4,4h, e 8,5h, as biomassas máximas são de 3,490, 3,800 e 1,700 e as taxas específicas de crescimento são de $0,137\text{h}^{-1}$, $0,159\text{h}^{-1}$ e $0,082\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Comparativamente ao controlo negativo observa-se que todas as amostras sofreram alterações, duplicando pelo menos o tempo de duplicação em relação ao controlo negativo, ou seja, todos os compostos interferem no crescimento celular da levedura. Este facto pode estar relacionado com o aumento da fase de latência, na qual a levedura tenta adaptar-se às condições experimentais de compostos testadas.

Observa-se ainda, uma alteração notável no valor de biomassa máxima na amostra CoMeOH podendo sugerir que este composto afecta o ciclo celular da levedura na interfase ou mitose, inibindo a duplicação populacional. Este evento sugere novamente que a levedura na presença deste composto demora mais tempo a adaptar-se às condições testadas, atingindo menor biomassa máxima do que nas outras condições.

3.2.3. Testes de viabilidade celular

Seguidamente, realizaram-se ensaios de viabilidade celular na levedura para cada uma das condições ($\frac{1}{2}$ CMI, Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH) de modo a validar as conclusões anteriores. Os ensaios de viabilidades celulares permitem contabilizar o número de unidades formadoras de colónias (UFC) por mL de amostra.

Inoculou-se a levedura com $\frac{1}{2}$ CMI dos compostos (Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH) durante aproximadamente 50h, e plaqueou-se em meio YPD diluições sucessivas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) em intervalos de tempo regulares tal como descrito na secção 2.3.7. As contagens foram efectuadas manualmente obtendo-se os resultados apresentados na Figura 3.7.

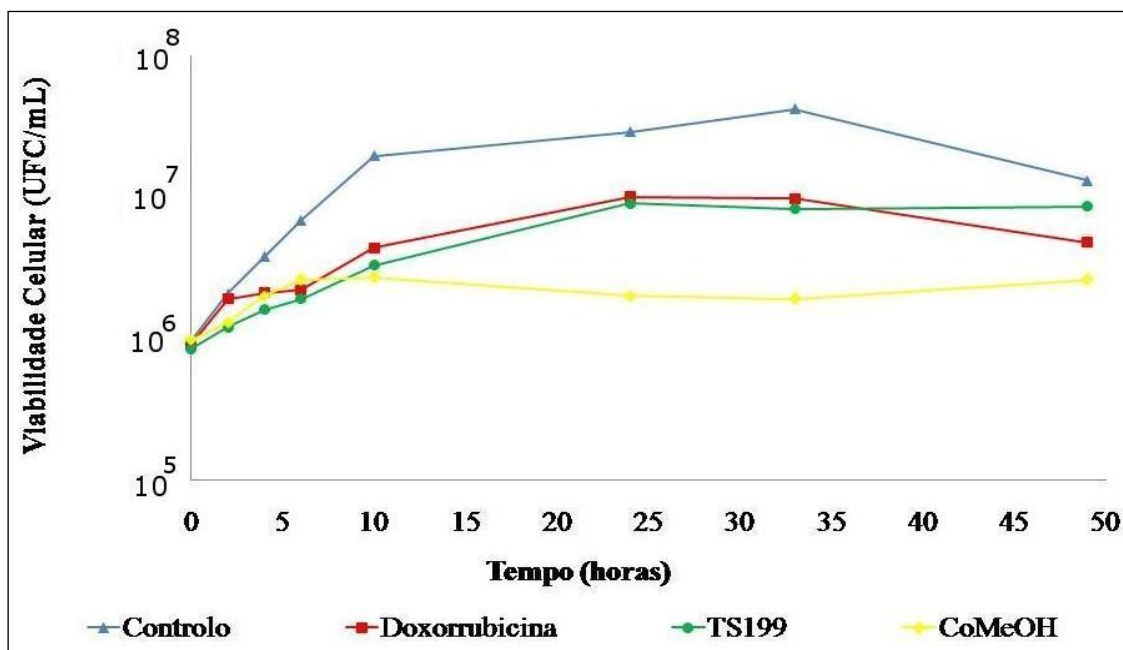


Figura 3.7: Representação gráfica das curvas de viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* na ausência (controlo negativo) e presença de Doxorrubicina (controlo positivo), TS199 e CoMeOH (compostos teste) a $\frac{1}{2}$ da CMI ($25,86 \mu\text{M} \pm 0,01$; $545,41 \mu\text{M} \pm 0,01$; $505,45 \mu\text{M} \pm 0,01$, respectivamente) ao longo do tempo.

Através da Figura 3.7 é possível inferir que todas as amostras iniciaram o crescimento celular com aproximadamente o mesmo número de células viáveis, $9,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Ao longo do tempo para o controlo negativo observou-se um aumento logarítmico de UFC por mL até um máximo de $4,2 \times 10^7$ UCF/mL, sendo que às 49h se observou uma diminuição da densidade celular. Este acontecimento pode dever-se à carência de nutrientes, acumulação de produtos inibitórios do metabolismo, elevada biomassa da levedura no meio MMB4, uma vez que se encontra num sistema fechado de crescimento.

Para os compostos Doxorrubicina e TS199 também se observou um aumento de UFC por mL atingindo-se um máximo de $1,0 \times 10^7$ e $9,0 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Novamente, às 49h de crescimento observa-se uma diminuição de células viáveis para a Doxorrubicina e às 33h para o TS199. Tal como no controlo negativo, esta diminuição pode dever-se aos parâmetros referidos anteriormente.

O composto CoMeOH apresenta um aumento de células viáveis apenas até às 6h atingindo $2,6 \times 10^6$ UCF/MI, mantendo um crescimento celular constante até às 49h. Esta informação parece sugerir que na presença de $\frac{1}{2}$ CMI do composto CoMeOH a levedura apenas consegue manter o número populacional constante, sugerindo novamente que este composto afecta o ciclo celular da levedura. Outra hipótese é a presença de elevada concentração de produtos inibitórios do metabolismo a partir das 6h de incubação com o composto CoMeOH afectando o crescimento da levedura.

3.2.4. Espécies reactivas de oxigénio

O stress oxidativo é um processo celular associado à sobre-expressão de ROS em sistemas biológicos aeróbios como subproduto do metabolismo energético. Este processo afecta inúmeras funções celulares e foi descrito como estando envolvido em diversas doenças, provavelmente devido à falha dos mecanismos de desintoxicação de xenobióticos (Nishikawa, 2008; Williams, 2006; Schumacker, 2006; Storz, 2005).

As ROS dividem-se em dois grupos, as ROS livres e ROS não reactivas. As ROS livres contêm um ou mais electrões desemparelhados e compreendem os radicais superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH), óxido nitroso (NO), alcóxido (RO) e peróxido (ROO). As ROS não reactivas incluem peróxido de hidrogénio (H_2O_2), peróxido orgânico (ROOH) e hipocloroso (HOCl) (Storz, 2005). De entre as ROS referidas anteriormente, sabe-se que o radical superóxido ou o peróxido de hidrogénio (subproduto do primeiro) estão implicados no desenvolvimento de inúmeras doenças entre as quais, o cancro. No entanto, a relação entre células cancerígenas e ROS é um pouco paradoxal. As ROS podem induzir danos suficientes no DNA para converter as células normais em células cancerígenas e quantidades suficientes de ROS em células cancerígenas (provocadas por radiação ou administração de agentes anti-tumorais) podem promover a morte celular devido ao stress oxidativo causado (Nishikawa, 2008; Schumacker, 2006; Storz, 2005).

O composto Doxorrubicina utilizado nestes ensaios foi identificado por diversos autores como indutor de ROS em diversas células tumorais (Salvatorelli *et al.*, 2009; Wang, 2004; Westmoreland *et al.*, 2009). Assim sendo, realizaram-se ensaios de ROS nos compostos TS199 e CoMeOH para averiguar se existe ou não produção de ROS pelas células de levedura *S. cerevisiae* na presença destes compostos.

Os ensaios de ROS foram realizados sujeitando a levedura a $\frac{1}{2}$ CMI dos compostos (Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH) durante aproximadamente 4h tal como descrito na secção 2.3.8. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.8.

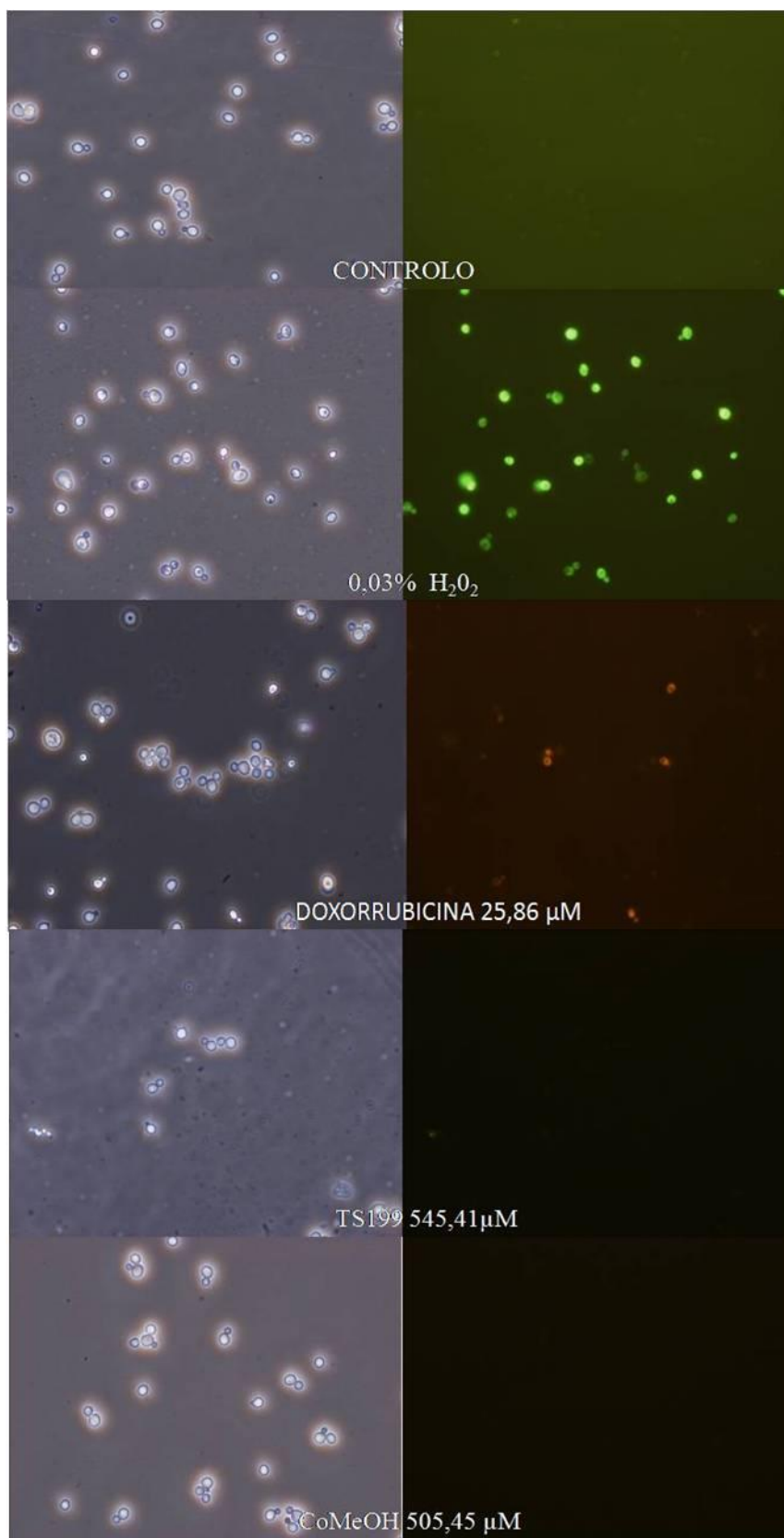


Figura 3.8: ROS em levedura *S. cerevisiae* BY4741 na ausência de composto (controlo negativo), presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (0,03%, controlo positivo para ROS), Doxorubicina (25,86 μM), TS199 (545,41 μM) e CoMeOH (505,45 μM) crescida em meio MMB4. À esquerda estão as imagens tiradas em campo claro e à direita estão as imagens de fluorescência correspondentes. Observação feita por microscopia de fluorescência (400X).

Os resultados obtidos nestes ensaios foram coerentes com o descrito na literatura, havendo produção de ROS na presença de peróxido de hidrogénio e Doxorubicina, observando-se as cores verde e amarelo, respectivamente.

É ainda importante referir que, a fluorescência observada no ensaio com o composto Doxorubicina (amarelo) não é idêntica ao ensaio com peróxido de hidrogénio (verde), uma vez que a cor vermelha do composto Doxorubicina interfere com o ensaio de MTS ocorrendo um “*quenching*” entre o fluoróforo e os iões do composto.

Para os compostos TS199 e CoMeOH não se observou fluorescência, concluindo-se que os compostos a $\frac{1}{2}$ CMI não induzem a produção de ROS nas células da levedura *S. cerevisiae*.

3.2.5. Análise proteómica

A técnica de proteómica permite analisar as proteínas expressas pelo genoma. Utilizou-se esta técnica para o reconhecimento dos alvos e modos de acção da levedura *S. cerevisiae* BY4741 em resposta à presença dos compostos em estudo, TS199 e CoMeOH, com o intuito de averiguar as suas capacidades como agentes anti-tumorais.

A técnica de proteómica utilizada baseou-se na electroforese de duas dimensões com posterior análise por espectrometria de massa denominada de FMF/MALDI-FT-ICR-MS.

Previamente, cresceu-se a levedura na ausência e na presença dos diferentes compostos (Doxorubicina, TS199, CoMeOH) numa concentração de $\frac{1}{2}$ CMI até uma $DO_{600nm} = 0.700 \pm 0.01$. De seguida, procedeu-se à extracção proteica das células da levedura, fez-se a precipitação proteica por TCA/DOC, a quantificação de cada amostra pelo método de Lowry modificado e a confirmação por *SDS-page*. Fez-se nova precipitação proteica com o Kit *2-D Clean-Up* para purificar e concentrar entre 250 a 300 μg de proteína de cada amostra e efectuar as electroforeses de 1ª dimensão e de 2ª dimensão.

Depois de corados os géis com Coomassie Blue como explicado na secção 2.3.13. foram seleccionados alguns *spots* para analisar por FMF/MALDI-FT-ICR-MS para cada uma das condições. Na Figura 3.9 estão representados os *spots* identificados para o controlo negativo (de cada condição), Doxorubicina, TS199 e CoMeOH para identificar por FMF/MALDI-FT-ICR-MS.

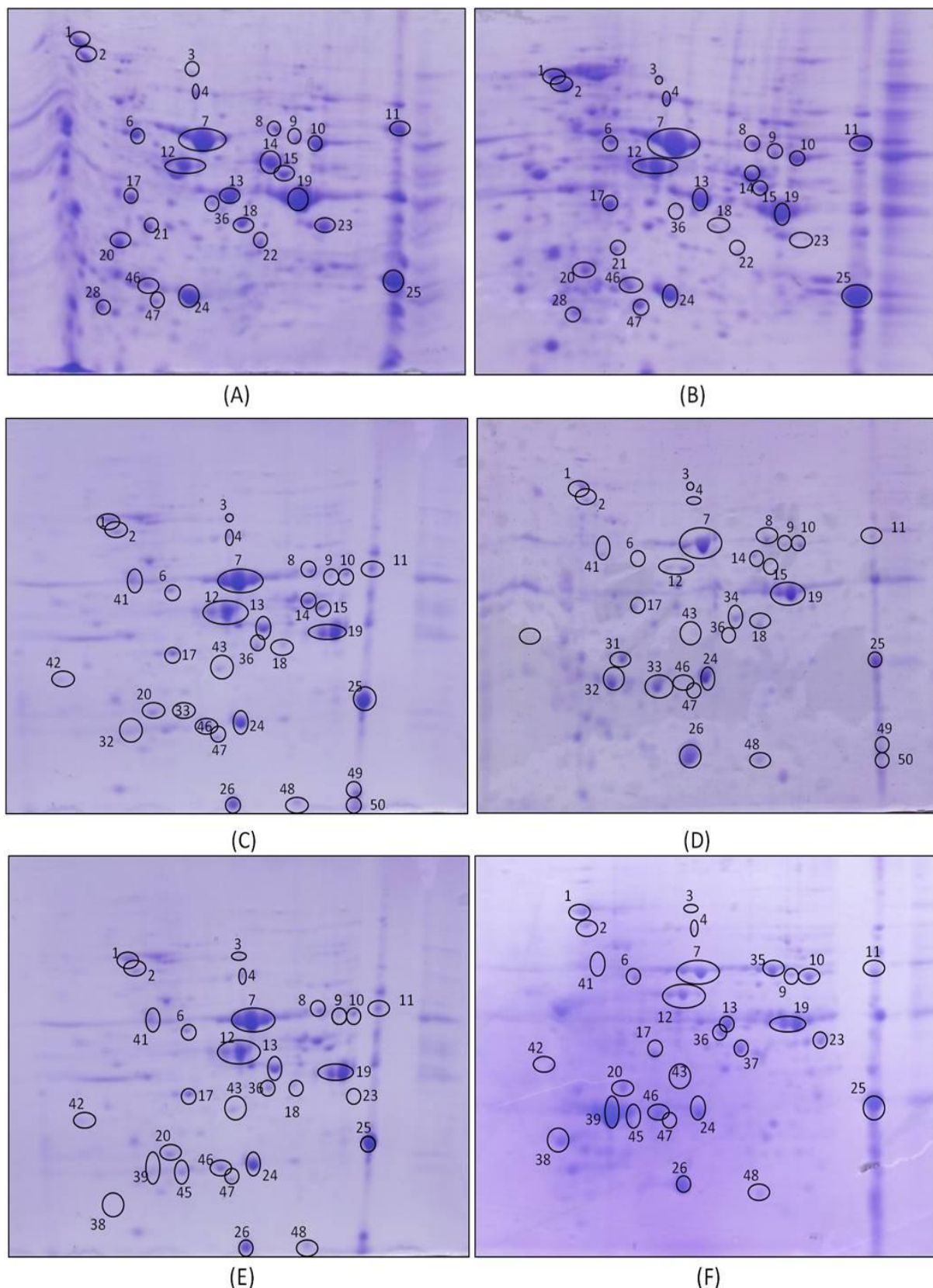


Figura 3.9: Géis de proteómica para (A) controlo negativo da Doxorubicina (B) Doxorubicina (C) controlo negativo do TS199 (D) TS199 (E) controlo negativo do CoMeOH (F) CoMeOH obtidos por 2-DE, a partir de extractos proteicos de levedura *S. cerevisiae* BY4741 crescida em MMB4 e recolhida durante a fase exponencial ($D_0 = 0,700 \pm 0,01$). Estão representadas as isoformas proteicas que foram identificadas por FMF/MALDI-FT-ICR-MS, para cada condição. As imagens (A) + (B); (C) + (D) e (E) + (F) representam conjuntos diferentes, nos quais estão representados a comparação de *spots* do composto com o respectivo controlo negativo.

No controlo negativo e nos ensaios com o composto Doxorrubicina, TS199, CoMeOH, a técnica de FMF/MALDI-FT-ICR-MS permitiu identificar um total de 29 proteínas ou seja, 41 isoformas proteicas.

Após a obtenção dos géis de proteómica e identificação dos *spots*, comparou-se cada condição (Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH) com o respectivo controlo negativo utilizando-se o programa *Progenesis SameSpots*, para identificar a variação de expressão de cada isoforma proteica. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Avaliação da variação de expressão de cada isoforma proteica identificada por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nos diferentes conjuntos de géis utilizando o programa *Progenesis SameSpots*.

Isoforma protéica	Número do spot	Variação de expressão controlo negativo <i>versus</i>		
		Doxorrubicina	TS199	CoMeOH
Adh1	14	-1.3	-4.6	n.d.
Dhom	47	+4.4	-6.5	-2.2
Ef1a	11	-1.1	-4.1	+1.1
Efb1	42	n.d.	-4.3	-1.8
Eno1	8 = 35	+1.1	-1.7	+2.4
Eno2	7	+1.0	-3.2	-1.9
	20=31	-4.8	-1.2	-1.3
Fbpa	12	+1.2	-8.1	-2.0
G3p3 Ou Gapdh3	19	-1.1	-3.2	-1.0
	22	-2.4	n.d.	n.d.
	23	-5.3	n.d.	+7.3
	36	-4.3	-2.3	+2.8
Gblp	46	-1.1	-3.6	+1.4
	43	n.d.	-8.3	-2.3
Hsp26	32	n.d.	+1.8	n.d.
	33	n.d.	+3.3	n.d.
	38	n.d.	n.d.	+12.0
	39	n.d.	n.d.	+6.7
Hsp31	45	n.d.	n.d.	+1.7
Hsp60	2	-1.1	-3.0	+1.3
Hsp71	1	+1.0	-2.9	+1.2
Hsp72	1	+1.0	-2.9	+1.2
	21	-1.0	n.d.	n.d.
Hsp75	6	-1.2	-4.9	-2.0
Hsp76	6	-1.2	-4.9	-2.0
Ilv5	15	+1.2	-3.4	n.d.
Ipyr	17	+1.4	-2.7	-1.0
Lys9	41	n.d.	-4.7	-1.9
Nacbl	48	n.d.	-13.1	-9.4
Pabp	3	+1.1	-4.9	-2.3
Pdc1	4	-1.5	-3.9	-1.8
Pgam 1	25	+1.2	-3.5	-1.2

Legenda: n.d.—não definido.

Tabela 3.3: Avaliação da variação de expressão de cada isoforma proteica identificada por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nos diferentes conjuntos de géis utilizando o programa *Progenesis SameSpots* (continuação).

Isoforma protéica	Número do spot	Variação de expressão controlo negativo <i>versus</i>		
		Doxorrubicina	TS199	CoMeOH
Pgk	9	+1.0	-1.7	+1.4
	10	-1.1	-1.9	+1.3
	13 = 34	+1.1	-3.5	+1.1
	18 = 37	-3.5	-2.6	+4.5
R112	49	n.d.	-3.6	n.d.
Rs20	50	n.d.	-10.8	n.d.
Sod1	26	n.d.	-5.1	-3.4
Tpi	24	+1.1	-2.8	-1.8
Tsa1	28	+2.5	n.d.	n.d.

Legenda: n.d.—não definido.

A interpretação dos resultados de proteómica obtida para cada proteína identificada por FMF/MALDI-FT-ICR-MS, compreendeu o estudo da localização celular, o gene e os processos biológicos envolvidos, assim como, a função molecular (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Proteínas identificadas por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nas diferentes condições testadas (controlo negativo, Doxorubicina ½ CMI, TS199 ½ CMI, CoMeOH ½ CMI) ordenadas pela localização na célula. Apresenta-se a descrição, os genes, os processos biológicos envolvidos e as funções moleculares de cada proteína (www.uniprot.org, acedido em Julho 2011; www.yeastgenome.org, acedido em Julho 2011).

Isoforma proteica	Descrição	Gene envolvido	Processos Biológicos	Funções Moleculares
Citoplasma				
Adh1	Álcool desidrogenase I	<i>ADH1</i>	Catabolismo de a.a. (leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano) pela via Ehrlich; biossíntese do etanol na fermentação; oxidação NADH	Oxidoreductase
Dhom	Homoserina desidrogenase	<i>HOM6</i>	Biossíntese de a. a. (isoleucina, metionina e treonina); biossíntese de cadeias laterais de a.a.	Oxidoreductase
Eno1	Enolase I	<i>ENO1</i>	Glicólise; gluconeogénese; regulação da fusão vacuolar não autofágica	Actividade hidratase fosfopiruvato
Eno2	Enolase II	<i>ENO2</i>	Glicólise; gluconeogénese; regulação da fusão vacuolar não autofágica	Actividade hidratase fosfopiruvato
Fbpa	Fructose 1,6-bisfosfato aldolase	<i>FBA1</i>	Glicólise; gluconeogénese	Actividade aldolase frutose-bisfosfato
G3p3 ou Gapdh3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3	<i>TDH3</i>	Apoptose; gluconeogénese; glicólise; processos metabólicos de ROS	Oxidoreductase
Gblp	Proteína G	<i>ASC1</i>	Proteína G acoplada a receptor da via de sinalização; mediador da via glicolítica; crescimento invasivo em resposta à limitação de glicose; regulação negativa da tradução.	Ligação à subunidade alfa da proteína G; inibidor de dissociação GDP; actividade de sinal transdutor
Hsp75	Proteína choque térmico ssb1	<i>SSB1</i>	Pós-transcrição de proteínas; falta de glucose; transcrição citoplasmática; regulação da transcrição fidedigna; exportação da subunidade ribossomal do núcleo; processamento do rRNA; término da transcrição.	Ligação ATP; actividade ATPase; ligação calmodulina; desenrolamento proteico
Hsp76	Proteína choque térmico ssb2	<i>SSB2</i>		
Ipyr	Pirofosfatase inorgânica	<i>IPP1</i>	Síntese de UDP-glucose interveniente na produção de glucogénio	Hidrolase
ys9	Sacaropina desidrogenase	<i>LYS9</i>	Biossíntese de a.a., biossíntese de Lisina	Oxidoreductase
Pgk	Cinase 3-fosfoglicerato	<i>PGK1</i>	Glicólise	Cinase; transferase
Rs20	Proteína ribossomal 40S	<i>RPS20</i>	Tradução citoplasmática; maturação de SSU-rRNA a partir do transcrito	Componente ribossomal
Tsa1	Tiorredoxina peroxidase I	<i>TSA1</i>	Homeostasia celular do processo redox; resposta celular ao stress oxidativo; <i>checkpoint</i> de danos DNA; protecção DNA; enrolamento proteico; regulação da tradução; idade replicativa celular; resposta ao hidróperóxido	Antioxidante; oxidoreductase; peroxidase

Tabela 3.4: Proteínas identificadas por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nas diferentes condições testadas (controlo negativo, Doxorubicina ½ CMI, TS199 ½ CMI, CoMeOH ½ CMI) ordenadas pela localização na célula. Apresenta-se a descrição, os genes, os processos biológicos envolvidos e as funções moleculares de cada proteína (www.uniprot.org, acedido em Julho 2011; www.yeastgenome.org, acedido em Julho 2011) (*Continuação*).

Isoforma proteica	Descrição	Gene envolvido	Processos Biológicos	Funções Moleculares
Citoplasma e Núcleo				
Hsp26	Proteína choque térmico 26	<i>HSP26</i>	Resposta ao stress	Chaperona
Nacb1	Complexo associado ao polipéptido nascente subunidade beta-1	<i>EGD1</i>	Transporte de moléculas; regulação da transcrição.	Repressor da tradução
Pabp	Proteínas de ligação poliadenilato, citoplasmáticas e nucleares	<i>PAB1</i>	Regulação da tradução; transporte; processamento e transporte mRNA.	Ligação de nucleótidos, de RNA poli-A e proteínas
Pdc1	Isoenzima I piruvato descarboxilase	<i>PDC1</i>	Catabolismo de a.a. (fenilalanina e triptofano); descarboxilação de piruvato em acetaldeído; biossíntese de cadeias laterais de a.a.	Descarboxilase liase
Citoplasma e Citoesqueleto				
Efla	Factor de elongação alfa-1	<i>TEF1</i>	Biossíntese proteica	Factor de elongação
Citoplasma, Parede celular e Núcleo				
Hsp71	Proteína choque térmico ssa1	<i>SSA1</i>	Enrolamento proteico; importação proteico para o núcleo; translocação proteica para a mitocondria; resposta ao stress; translocação de proteínas co-traduzidas, dependentes de SRP, com alvo membranas; tradução	Ligação ATP; actividade ATPase; desenrolamento proteico
Citoplasma, Parede celular e Membrana do vacuolo				
Hsp72	Proteína choque térmico ssa2	<i>SSA2</i>	Enrolamento proteico; resposta ao stress; translocação de proteínas co-traduzidas, dependentes de SRP, com alvo membranas	Ligação ATP; actividade ATPase; desenrolamento proteico
Citoplasma e Mitocôndria				
Sod1	Dismutase do superóxido [Cu-Zn]	<i>SOD1</i>	Resposta a ROS dependente da idade; homeostasia celular com os iões cobre e zinco; organização da parede celular; metabolismo do superóxido; regulação positiva da actividade de factores de transcrição.	Antioxidante, oxireductase
Citosol e Mitocôndria				
Pgam 1	Mutase I fosfoglicerato	<i>GPM1</i>	Glicólise; gluconeogénese	Isomerase
Mitocôndrias				
Ilv5	Ácido cetol redutor-isomerase	<i>ILV5</i>	Manutenção do genoma mitocondrial; biossíntese de cadeias laterais de a.a.	Ligação ao DNA; actividade ácido cetol redutor-isomerase
Tpi	Triose-fosfato isomerase		Glicólise; gluconeogénese;	

Tabela 3.4: Proteínas identificadas por FMF/MALDI-FT-ICR-MS nas diferentes condições testadas (controlo negativo, Doxorrubicina ½ CMI, TS199 ½ CMI, CoMeOH ½ CMI) ordenadas pela localização na célula. Apresenta-se a descrição, os genes, os processos biológicos envolvidos e as funções moleculares de cada proteína (www.uniprot.org, acedido em Julho 2011; www.yeastgenome.org, acedido em Julho 2011) (*Continuação*).

Isoforma proteica	Descrição	Gene envolvido	Processos Biológicos	Funções Moleculares
Matriz Mitocondrial				
Hsp60	Proteína choque térmico 60	<i>HSP60</i>	Resposta ao stress	Chaperona
Ribossomas				
Ef1b	Factor de elongação beta-1	<i>EFB1</i> ou <i>TEF5</i>	Biossíntese proteica	Factor de elongação
Outros				
Hsp31	Proteína choque térmico 31	<i>HSP31</i>	Desconhecido	Provável chaperona; hidrolase; actividade tipo cisteína protease
R112	Proteína ribossomal S60	<i>RPL12A</i>	Tradução citoplasmática; montagem da subunidade grande ribossomal	Contituínte estrutural do ribossoma

Do total de proteínas identificadas (29), 4 apresentam-se nos géis através de diversas isoformas proteicas, nomeadamente as proteínas Eno2, G3p3, Pgk e Hsp26. Mais especificamente, a proteína Eno2 está caracterizada pelos *spots* 7 e 20 (31); a G3p3 pelos *spots* 19, 22, 23, 36 e 46; a Pgk pelos *spots* 9, 10, 13 (34) e 18 (37) e por fim, a Hsp26 pelos *spots* 32, 33, 38 e 39. As isoformas proteicas são diferentes formas de uma mesma proteína codificadas por genes diferentes ou provenientes do mesmo gene através de “*splicing*” alternativo ou ainda por modificações pós-tradução diferentes. Esta estratégia celular permite responder a modificações ambientais (Berg *et al.*, 2007; Klug e Cummings, 2002)

Comparando as condições controlo negativo *versus* Doxorrubicina na presença de ½ CMI (25,86 µM) (Figura 3.9 – (A) + (B)) e com o auxílio do programa *Progenesis SameSpots* identificou-se um total de 23 proteínas das quais 2 foram sobre-expressas (variação da expressão ≥ 1.5), 4 foram sub-expressas (variação da expressão ≤ 1.5) e 17 não sofreram alteração significativa da sua expressão (variação $-1,4 > x < +1,4$).

Nestas condições, as enzimas Tsa1 e Dhom, ambas encontradas no citoplasma da célula e enzimas que catalisam reacções de oxidação-redução, encontram-se sobre-expressas. A enzima Tsa1 está envolvida na resposta celular contra o stress oxidativo (Herrero, 2007). A sobre-expressão desta enzima coincide com os ensaios referidos na secção 3.2.4, nos quais se verificou a indução de ROS na levedura na presença de ½ CMI de Doxorrubicina. A enzima Dhom, existente em microrganismos e plantas, está envolvida na biossíntese dos a.a. isoleucina, metionina e treonina através da via do aspartato. A sua sobre-expressão indica um aumento da biossíntese dos a.a. referido anteriormente (Jacques *et al.*, 2001).

As isoformas proteicas sub-expressas identificadas foram Pdc1, G3p3, Pgk e Eno2. A Pdc1 (Figura 3.10) é uma enzima importante na descarboxilação do piruvato em acetaldeído e dióxido de carbono. Alterações nesta via ou seja, no balanço redox das células, influenciam a reposição de NAD^+ efectuada durante o metabolismo do piruvato pela via fermentativa e assim afectam a via glicolítica.

A enzima G3p3 (Figura 3.10) catalisa a conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfogliceraldeído durante a glicólise com consumo de NAD^+ . A Pgk (Figura 3.10) é a enzima que catalisa a transferência do grupo fosforil do acil fosfato do 1,3-bifosfoglicerato mediado por ADP para produzir ATP em 3-fosfoglicerato, necessário na via da glicólise. A Eno2 (Figura 3.10) catalisa a formação do fosfoenolpiruvato por desidratação do 2-fosfoglicerato durante a glicólise e a sua reacção inversa, durante a gluconeogénese. A sua expressão é induzida na presença de glucose sendo assim, não era expectável a sua sub-expressão uma vez que foi feito a adição de glucose em excesso ao meio de crescimento das culturas de levedura. No entanto, ao analisar a expressão de proteínas na Tabela 3.3 verificou-se que a proteína Eno1 (Figura 3.10) está a ser sobre-expressa. Esta proteína também catalisa a conversão do 2-fosfoglicerato em do fosfoenolpiruvato durante a glicólise e a reacção inversa durante a gluconeogénese mas a sua expressão é reprimida na presença de glucose. Analisando

estes resultados, pode-se sugerir que a célula tentou compensar a sub-expressão de Eno2, sobre-expressando Eno1.

Estes resultados parecem confirmar a suposição anterior, ou seja, a sub-expressão da enzima Pdc1 deve-se ao stress oxidativo sofrido pelas células da levedura devido à produção de ROS na presença de ½ CMI de Doxorubicina, interferindo na glicólise. Não existindo reposição suficiente do NAD⁺ proveniente da formação de etanol a partir do piruvato, este não pode ser consumido na conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfogliceraldeído, afectando os passos subsequentes da glicólise.

Com estes resultados pode-se averiguar que o composto Doxororrubicina (com acção antitumoral comprovada) a $\frac{1}{2}$ CMI inibe as vias metabólicas da glucose e do piruvato da levedura, activa as vias de stress oxidativo, actuando no núcleo e no citoplasma das células.

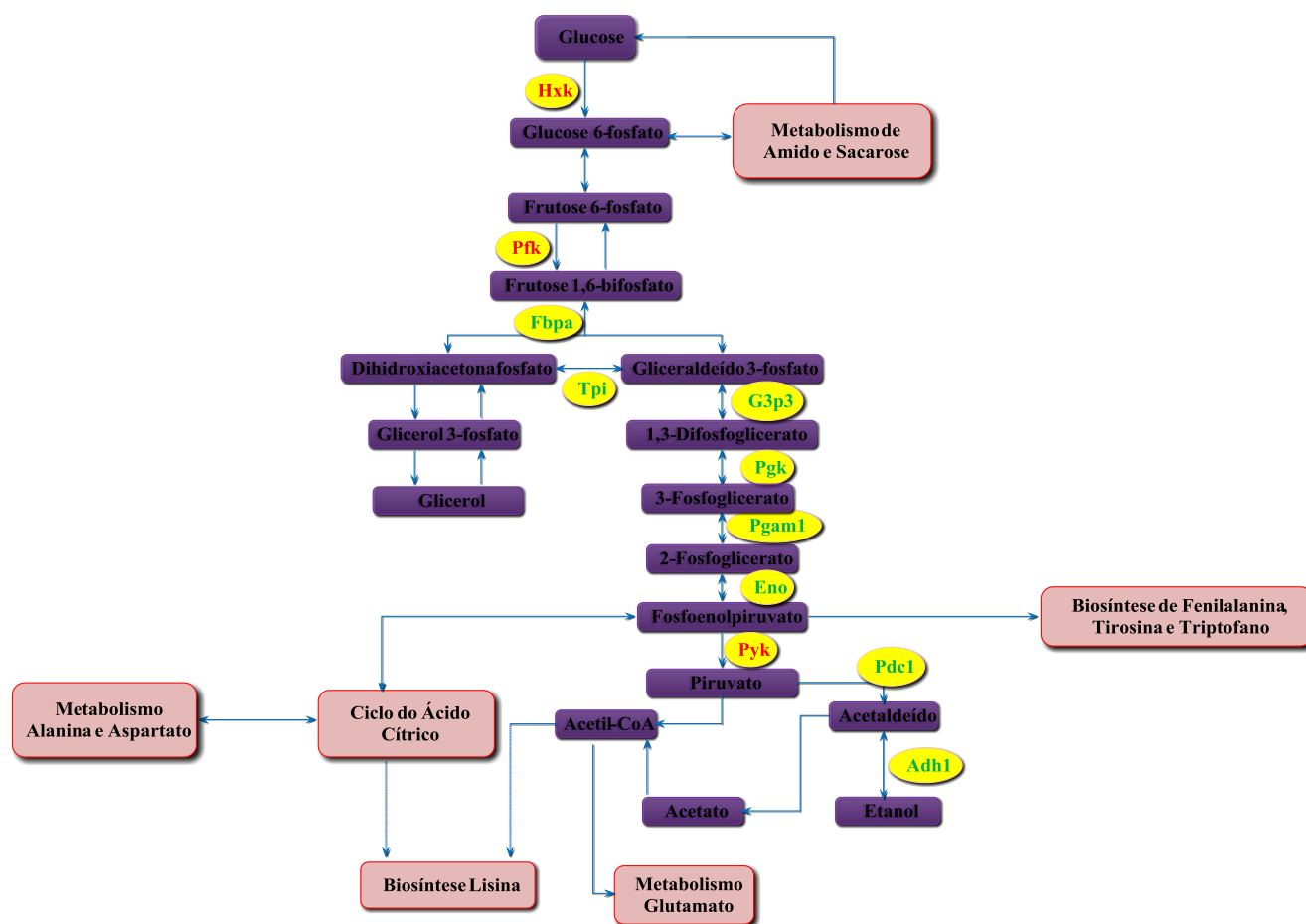


Figura 3.10: Via da glicólise e do piruvato da levedura *S. cerevisiae*. Relação com os metabolismos de amido, sacarose, alanina, aspartato e glutamato e biossíntese de lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano (vermelho: enzimas de ponto de controlo da via da glicólise; verde: enzimas identificadas pela proteómica (adaptado de Pham e Wright, 2007)).

Confrontando os resultados de proteómica obtidos para as condições controlo negativo *versus* TS199 na presença de ½ CMI (545,41 µM) (Figura 3.9 – (C) com (D)) com o programa referido anteriormente, identificou-se um total de 29 proteínas das quais 1 foi sobre-expressa (variação da expressão ≥ 1.5), 26 foram sub-expressas (variação da expressão ≤ 1.5) e 2 não tiveram alteração significativa na sua expressão (variação $-1,4 > x < +1,4$).

As isoformas proteicas sobre-expressas na presença de TS199 correspondem aos *spots* 32 e 33 e foram identificados como sendo a proteína Hsp26. A proteína Hsp26 corresponde a uma pequena proteína de choque térmico citosólica pertencente à família das chaperonas, que desempenha um papel preventivo na agregação de proteínas não nativas, ligando-as em complexos estáveis. A acumulação de agregados proteicos provoca danos na célula, promovendo a morte celular. Quando há morte celular, as proteínas agregadas são libertadas para o meio extracelular, prejudicando as células circundantes. A sobre-expressão desta proteína indica que as células da levedura estão em stress devido a um choque térmico, paragem na fase estacionária do desenvolvimento celular, falta de azoto, choque osmótico ou ainda devido a perda constitutiva de proteína de choque térmico da família Hsp70 (Alberts *et al.*, 2002; Burnie *et al.*, 2005; White *et al.*, 2006).

De facto, pela Tabela 3.3, verifica-se a sub-expressão de 4 proteínas de choque térmico pertencentes a família das Hsp 70, nomeadamente Hsp71, Hsp72, Hsp 75 e Hsp 76. Inicialmente, as proteínas Hsp 70 eram identificadas apenas em situação de stress celular. Mais tarde, descobriu-se que estas proteínas ocorriam também em condições normais desempenhando diversas funções como por exemplo, auxiliar no enrolamento de proteínas recém-sintetizadas, guiar a translocação de proteínas através de membranas, separar estruturas proteicas oligoméricas, facilitar a degradação proteolítica de proteínas instáveis e controlar a actividade de enrolamento de proteínas reguladoras, incluindo factores de transcrição. As proteínas Hsp71 e Hsp72 são expressas constitutivamente pela célula estando localizadas no citoplasma, parede celular e núcleo, ou citoplasma, parede celular e membrana do vacúolo, respectivamente. As proteínas Hsp75 e Hsp76 encontram-se no citoplasma e protegem a célula da formação de agregados proteicos (Bukau e Horwich, 1998; Burnie *et al.*, 2005). Sendo assim, pode-se inferir que a expressão das Hsp71, Hsp 72, Hsp75 e Hsp76 no controlo negativo era expectável (produzida basalmente) e que a sub-expressão no TS199 deve-se a sobre-expressão da proteína Hsp26.

Outra proteína sub-expressa é a Hsp60. Esta proteína está presente na matriz mitocondrial das células e é essencial ao crescimento celular da levedura a qualquer temperatura, sendo que existe sobre-expressão quando sujeita a temperatura igual a 42°C. É também reconhecida a sua colaboração com as Hsp70 para efectuar o enrolamento de proteínas. Sendo assim, a sua sub-expressão no ensaio TS199 poderá estar relacionada com a sub-expressão das Hsp70 (Burnie *et al.*, 2005).

No gel de proteómica do composto TS199 quando comparado como o controlo negativo existem ainda outras proteínas sub-expressas nomeadamente, Dhom, Pdc1, G3p3, Pgk, Eno1, Eno2, Fbpa, Adh1, Ipyr, Pgam, Tpi, Pabp, Lys9, Ef1a, Efb1, Ilv5, Rl12, Rs20, Gblp, Nacb1 e Sod1.

As proteínas Dhom, Pdc1, G3p3, Pgc, Eno2 e Eno1 já foram caracterizadas na análise do gel de proteómica da Doxorubicina. Estas proteínas, excepto Dhom (síntese de a.a.), estão envolvidas na glicólise das células. Relembra-se que a sub-expressão das proteínas Pdc1, G3p3, Pgc e Eno2, está relacionada com a inibição das vias metabólicas da glucose e do piruvato da levedura.

Neste ensaio, a sub-expressão de proteína Eno 1 (Figura 3.10) justifica-se uma vez que a glucose é adicionada ao meio por excesso e que a sua expressão é reprimida na presença de glucose.

A enzima citoplasmática Fbpa (Figura 3.10) expressa pelo gene *FBA1* é independente da disponibilidade de glucose e participa na via glicolítica e na gluconeogénese da célula, catalisando a conversão da frutose 1,6-bisfosfato em gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. A isomerase Tpi (Figura 3.10) catalisa a interconversão da dihidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reacção é importante uma vez que, aumenta a quantidade de gliceraldeído 3-fosfato disponível para a glicólise. Quando esta enzima é inibida, a glicólise ocorre com menor rendimento, verificando-se a acumulação de dihidroxiacetona fosfato e formação de metilglioxal (composto tóxico). Mutantes sem Tpi têm como produto final da glucose, glicerol em vez de etanol (Compagno *et al.*, 2001). Analisando estas duas últimas proteínas (Fbpa e Tpi) pode-se inferir que estão interligada e que a sub-expressão de Fbpa irá afectar o fornecimento de produto utilizado pela enzima Tpi na formação de gliceraldeído-3-fosfato, afectando os passos seguintes da via glicolítica.

A enzima Adh1 (Figura 3.10) tem actividade *redox* intervindo na redução do acetaldeído em etanol, último passo do metabolismo do piruvato onde há regeneração de parte do NAD^+ , percussor da via glicolítica. A sub-expressão desta proteína irá afectar conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfogliceraldeído e assim a produção de piruvato.

A mutase I fosfoglicerato (Figura 3.10) catalisa a conversão do 3-fosfoglicerato em 2 fosfoglicerato na glicólise. A sua sub-expressão poderá ser consequência de passos anteriores, nomeadamente sub-expressão das proteínas Fbpa, Tpi, G3p3 e Pgc. Mais uma vez, esta sub-expressão irá inibir os passos seguintes da glicólise.

A enzima Ipyr presente no citoplasma da célula hidrolisa o pirofosfato em ortofosfato favorecendo a síntese de UDP-Glicose interveniente na produção de glucogénio. A sub-expressão desta enzima poderá afectar o metabolismo celular do fosfato.

A proteína Pabp liga-se à cauda poli-A do mRNA e parece ser um mediador importante na biogénese do mRNA, encontrada no citoplasma e no núcleo da célula.

As proteínas Efla e Efb1 são factores de elongação interveniente na síntese proteica da célula. A primeira está presente no citoplasma e citoesqueleto da célula, a segunda nos ribossomas. O factor de elongação alfa-1 participa na ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossoma durante a síntese proteica e o factor de elongação beta-1 estimula a hidrólise de GTP necessário ao Efla. A sub-expressão destas proteínas poderá inibir a síntese proteica (Berg *et al.*, 2007).

A proteína Nac1 codificada pelo gene *EGD1* é a subunidade $\beta 1$ de um complexo proteico que confere protecção a péptidos recém sintetizados, evitando a sua ligação prematura com proteínas citosólicas (Reimann *et al.*, 1999).

A isomerase Ilv5 encontra-se no núcleo das mitocôndrias e está envolvida na biossíntese de cadeia de a.a e na manutenção do DNA mitocondrial.

A enzima Lys9 encontra-se no citoplasma, tem acção de oxidoreductase e intervém na via de biossíntese de a.a, principalmente na biossíntese de lisina.

A proteína R112 é um constituinte da subunidade grande do ribossoma 60S e as proteínas Rs20 e Gblp são constituintes da pequena subunidade ribossomal 40S (Gerbasi *et al.*, 2004).

Analisando a função das proteínas Pabp, Efla, Efb1, Nac1, Ilv5, Lys9, R112, R120 e Gblp pode-se inferir que, na levedura *S. cerevisiae*, o composto TS199 inibe a biossíntese de a.a e a biossíntese proteica da célula.

Por fim, a proteína Sod1 tem um papel importante na desintoxicação de radicais de oxigénio normalmente produzidos pela célula, sendo expressa basalmente. A sua sub-expressão indica que a célula está a inibir os níveis de desintoxicação celular.

Com base nos resultados obtidos, o complexo de escorpionato TS199 a $\frac{1}{2}$ CMI na levedura *S. cerevisiae* BY4741, parece interferir em vários processos biológicos da célula tais como o metabolismo da glucose, o metabolismo do piruvato, processos de biossíntese de a.a. (treonina, metionina, isoleucina, lisina) assim como na transcrição e tradução de mRNA, interferindo na síntese de proteínas.

À semelhança dos ensaios anteriores, relacionaram-se os resultados de proteómica obtidos para as condições controlo negativo *versus* CoMeOH na presença de $\frac{1}{2}$ CMI (505,45 μ M) do composto (Figura 3.9 – (E) com (F)). Identificou-se um total de 28 proteínas das quais, 5 foram sobre-expressas (variação da expressão ≥ 1.5), 13 foram sub-expressas (variação da expressão ≤ 1.5) e 10 não tiveram alteração significativa na sua expressão (variação $-1,4 > x < +1,4$). Neste ensaio, os *spots* com sobre-expressão foram 23, 35, 36, 37, 38, 39 e 45, correspondendo às isoformas proteicas Hsp26 (38 e 39) e Hsp31, G3p3 (23 e 36), Eno1 (35), Pgk (37). As proteínas sub-expressas foram Hsp75, Hsp76, Pabp, Pdc1, Lys9, Eno2, Fbpa, Efb1, Gblp, Dhom, Tpi, Sod1 e Nac1.

Observou-se, tal como no TS199, a sobre-expressão da proteína Hsp26 e a sub-expressão das proteínas Hsp75 e Hsp76 (Hsp70). Outra proteína sobre-expressa é a Hsp31. Os mecanismos nos quais esta proteína está envolvida são pouco conhecidos. No entanto, parece estar relacionada com a remoção de metais acumulados na célula quando sujeita a stress (Goyal e Mande, 2008).

Observando a expressão das proteínas Fbpa, Tpi, G3p3, Pgk, Eno1, Eno2 e Pdc1 neste ensaio, na fase de crescimento com $DO = 0.700 \pm 0.01$, a levedura parece ter iniciado a via metabólica da gluconeogénese, uma vez que, se observou a sobre-expressão das proteínas Eno1, Pgk e G3p3 e a sub-expressão do Pdc1 do metabolismo do piruvato assim como das proteínas Fbpa, Tpi e Eno2 da via glicolítica. Este resultado pode explicar o crescimento (secção 3.2.2) e a viabilidade celular (secção

3.2.3) observados anteriormente, visto que a célula parece estar a utilizar as duas vias em simultâneo (Glicólise e Gluconeogénese).

A sub-expressão das proteínas Dhom, Lys9, Efb1, Pabp, Nacb, Gblp e Sod1 indica inibição da expressão da biossíntese de a.a., nomeadamente treonina, metionina, isoleucina e lisina; na expressão da biossíntese proteica; no transporte do transcrito mRNA e na protecção das células contra ROS.

À semelhança do composto TS199, o composto CoMeOH numa concentração de ½ CMI, interfere com processos biológicos da célula, entre os quais o metabolismo da glucose e do piruvato, a via de gluconeogénese, processos de biossíntese de a.a. assim como na transcrição e tradução de mRNA, interferindo na síntese de proteínas.

Comparando os complexos de escorpionato com a Doxorrubicina, é possível concluir que estes 3 compostos convergem na inibição do metabolismo energética da levedura, nomeadamente no metabolismo da glucose e do piruvato.

Reflectindo sobre o conjunto de resultados obtidos para os compostos TS199 e CoMeOH, nas linhas tumorais HCT116 e HepG2 e na levedura *S. cerevisiae*. É possível inferir que o complexo de escorpionato CoMeOH parece ter maior capacidade inibitória do que o TS199, uma vez que de um modo geral, possui concentrações de citotoxicidade (linhas tumorais) e CMI (levedura) inferior ao TS199.

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

O trabalho desenvolvido tinha como objectivo avaliar o potencial citostática, os alvos e o modo de acção dos compostos designados por TS199 - $[\text{CuCl}_2\{\text{HOCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}]$ e CoMeOH - $\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}_2 \cdot [\text{Co}\{\text{OHCH}_2\text{C}(\text{pz})_3\}(\text{H}_2\text{O})_3]_2(\text{Cl})_6$. Para tal, compararam-se os resultados obtidos com o antibiótico antracílico Doxorrubicina, o qual é reconhecido como agente anti-neoplásico.

Nos ensaios utilizaram-se linhas tumorais HCT116 e HepG2 e, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* estirpe BY4741.

Numa primeira fase, determinou-se a viabilidade celular / citotoxicidade e morte celular nas linhas tumorais na ausência e presença dos compostos em estudo para diferentes concentrações.

Relativamente aos ensaios controlo com DMSO (ensaios do composto Doxorrubicina) e sem DMSO (ensaios com o composto TS199 / CoMeOH), observou-se uma percentagem de viabilidade celular de 100%, ou seja, o controlo negativo com e sem DMSO pôde ser utilizado na comparação das linhas tumorais na presença dos compostos. Por outro lado, o ensaio de Hoechst indica uma elevada densidade celular e e baixa percentagem de células apoptóticas ($< 10\%$).

Quanto aos ensaios do composto Doxorrubicina, ambos os ensaios foram realizados nas células HCT116. Observou-se que no ensaio de MTS existe uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de composto (intervalo de concentrações 0,1 a 125 μM) e considerou-se a concentração de 10 μM como sendo o valor que induz citotoxicidade nas células HCT116. No ensaio de apoptose, utilizou-se a concentração de 0,5 μM , uma vez que esta concentração ainda permite observar algumas células ao microscópio. Este ensaio permitiu confirmar que o antibiótico Doxorrubicina interfere com a via de apoptose das células HCT116. Quanto à linha HepG2, verificou-se que o composto Doxorrubicina possui actividade citotóxica. Em concentrações semelhantes, parece ser mais eficaz em células HCT116 do que em HepG2. Sendo assim, este composto pôde ser utilizado como referência de acção citostática no presente estudo.

Nos ensaios MTS efectuados nas linhas HCT116 e HepG2 com o composto TS199 observou-se diminuição das viabilidades celulares em ambas as linhas, tal como nos ensaios do composto Doxorrubicina, concluindo-se que o composto TS199 possui actividade citostática. Os resultados mostram que o composto TS199 parece ser mais eficaz na linha tumoral HepG2 uma vez que para a menor concentração testada (500 μM) verifica-se um efeito inibitório superior.

Conclui-se também que a concentração de composto TS199 de 500 μM em HepG2 e 1000 μM em HCT116, são as concentrações consideradas validas para obter citotoxicidade significativa. O ensaio de Hoechst permitiu concluir que o composto TS199, tal como a Doxorrubicina, induz apoptose nas células HCT116.

Por fim, para os ensaios realizados com o composto CoMeOH, tal como os compostos Doxorrubicina e TS199, observou-se uma diminuição da viabilidade celular no ensaio de MTS em ambas as linhas tumorais, concluindo-se que este composto também possui actividade citostática. O CoMeOH, para as mesmas concentrações (500, 1000 e 2000 μM), parece possuir o mesmo efeito citotóxico em ambas as linhas tumorais testadas. Para este composto, conclui-se que 500 μM é a concentração necessária para induzir elevada citotoxicidade em ambas as linhas. O ensaio de Hoechst permitiu inferir que o composto também interfere na apoptose destas linhas celulares.

Analogamente à Doxorrubicina, os compostos TS199 e CoMeOH possuem actividade citostática e interferem na apoptose celular das linhas tumorais HCT116 e HepG2.

Como perspectivas futuras, seria interessante confirmar os estudos de apoptose efectuados pelo método de coloração de Hoechst, utilizando a técnica de citometria de fluxo com o kit *Annexin-V FITC Apoptosis* para se identificar com maior exactidão a percentagem de células apoptóticas e diferenciar as células em *early* apoptose, *late* apoptose e necrose.

Numa segunda fase, efectuaram-se os estudos na levedura *S. cerevisiae* estirpe BY4741, começando-se com a determinação da CMI para caracterizar a curva de crescimento celular; a viabilidade celular; a actividade de ROS e a proteómica na ausência e presença de $\frac{1}{2}$ CMI dos compostos Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH.

A CMI obtida para os diversos compostos em estudo foi de 51,73, 1090,83 e 1010,90 μM para a Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH, respectivamente. Estas concentrações traduzem a actividade do composto como agente anti-microbiano. Sendo assim, concluiu-se que a Doxorrubicina tem maior acção inibitória do que o TS199 e CoMeOH, para menor concentração de composto. É possível concluir que os compostos TS199 e CoMeOH têm uma concentração inibitória semelhante.

Parâmetros tais como, o tempo de duplicação, a taxa específica de crescimento, a biomassa máxima atingida e número de células viáveis (UCF/mL) estudados a partir da caracterização do crescimento celular e da viabilidade celular permitiram perceber o fenótipo da levedura na ausência e presença de $\frac{1}{2}$ CMI do composto ao longo do tempo (aproximadamente 50h).

Os resultados obtidos demonstram que o controlo negativo, pode ser utilizado como amostra padrão para comparar os parâmetros dos ensaios Doxorrubicina, TS199 e CoMeOH, uma vez que, os resultados obtidos foram coerentes com a literatura.

Mantendo as mesmas condições experimentais (meio, temperatura, pH), estes resultados permitem inferir que a levedura na presença do composto CoMeOH é mais inibida uma vez que, apresenta um maior tempo de duplicação, menor taxa específica de crescimento, biomassa máxima e número de células viáveis da levedura nesta condição. Seguem-se a este composto, a Doxorrubicina e o TS199, com menor inibição da levedura.

Os ensaios de ROS, permitem concluir que a Doxorrubicina induz a formação de ROS enquanto os compostos TS199 e CoMeOH não.

Numa terceira fase, recorreu-se ao estudo do proteoma da levedura durante a fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,700 \pm 0,01$) do crescimento da levedura, para averiguar os mecanismos de acção e os alvos da levedura quando na presença dos diferentes compostos.

Dos géis de proteómica obtidos para os três compostos, conseguiu-se apurar um total de 29 proteínas, às quais correspondem 41 isoformas proteicas.

No caso da Doxorrubicina, identificou-se um total de 23 proteínas. Destas, 6 sofreram alterações: Tsa1 e Dhom que foram sobre-expressas e, as proteínas Pkg, Eno2, G3p3 e Pdc1 que foram sub-expressas. Este composto parece afectar principalmente mecanismos que ocorrem no citoplasma e núcleo da célula da levedura, inibindo o metabolismo do piruvato e da glucose e activando vias de stress oxidativo e de síntese de a.a..

Relativamente ao composto TS199, identificou-se um total de 29 proteínas sendo que 26 proteínas foram sub-expressas (Hsp71, Hsp72, Hsp75, Hsp76, Hsp60, Dhom, Pdc1, G3p3, Pkg, Eno1, Eno2, Fbpa, Adh1, Ipyr, Pgam, Tpi, Pabp, Lys9, Efb1, Efb1, Ilv5, R112, Rs20, Gblp, Nacb1, Sod1) e 1 proteína foi sobre-expressa (Hsp 26), comparando com a condição controlo negativo. Através destes resultados conclui-se que o composto TS199 afecta a célula, actuando a nível do citoplasma, núcleo, citoesqueleto, parede celular, membrana do vacúolo, mitocôndria, citosol e ribossoma. Este composto inibe o metabolismo da glucose e do piruvato, os processos de transcrição e tradução de mRNA, interferindo na biossíntese de a.a. e de proteínas.

Por fim, relativamente ao composto CoMeOH, identificou-se um total de 28 proteínas sendo que 13 proteínas (Hsp75, Hsp76, Fbpa, Tpi, Eno2, Pdc1, Dhom, Efb1, Gblp, Lys9, Nacb, Pabp, Sod1,) encontram-se sub-expressas e 5 proteínas sobre-expressas (Hsp26, Hsp31, G3p3, Pkg, Eno1). Estes resultados permitem concluir que este composto tem por alvos o citoplasma, núcleo, mitocôndria e ribossoma da célula. À semelhança do TS199, inibe o metabolismo da glucose e do piruvato assim como processos de transcrição e tradução de mRNA, interferindo na biossíntese de a.a. e de proteínas. Na presença deste composto, observaram-se outras respostas nomeadamente, a activação da via do gluconeogénese e a sobre-expressão da proteína Hsp31 que parece estar relacionada com a remoção de metais.

Comparando os três compostos verificou-se que convergem na inibição do metabolismo da glucose e do piruvato.

Como trabalho futuro, seria interessante identificar as enzimas hexocinase (Hxk), fosfofrutocinase (Pfk) e piruvato cinase (Pyk) para validar as conclusões anteriores. Estas 3 enzimas foram identificadas como pontos de controlo da via glicolítica, permitindo extrapolar o estudo de enzimas metabólicas em levedura para células tumorais.

Seria interessante testar a toxicidade dos compostos TS199 e CoMeOH num modelo *in vivo* como por exemplo, o peixe zebra (*Danio rerio*).

O estudo efectuada nesta dissertação permitiu inferir sobre a capacidade citostática e indução de apoptose em linhas tumorais; inibição do crescimento da levedura por sub-expressão e sobre-

expressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético da levedura, induzida pelos compostos TS199 e CoMeOH.

5. Referências bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science – Taylor & Francis group, 4ªed. New York, USA.
- Azevedo, C. 1999. Biologia celular e molecular. Lidel – edições técnicas, lda. Lousã, Portugal.
- Basseville, A., Preisser, L., Trecesson, S. C., Boisdron-Celle, M., Gamelin, E., Coqueret, O. e Morel, A. 2011. Irinotecan induces steroid and xenobiotic receptor (SXR) signaling to detoxification pathway in colon cancer cells. *Molecular Cancer*. 10: 1-37.
- Beaver, L. M., Strottner, G. e Klein, M. K. 2010. Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006–2008). *JAVMA*. 237: 1052-1055.
- Benchechrone, M. N., Pourquier, P., Schoot, B. e Robert, J. 1993. Doxorubicina-induced lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in tumor cell lines selected for resistance to doxorubicin. *Eur. J. Biochem*. 211: 141-146.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. e Stryer, L. 2007. Biochemistry. 6ª ed. W. H. Freeman and Company. EUA.
- Berwick, M. e Vineis, P., 2000. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *Journal of the National Cancer Institute*. 92: 874-897.
- Bjornsti, M-A. 2002. Cancer therapeutics in yeast. *Cancer Cell*. 2: 267-273.
- Boman, B. M. e Wicha, M. S. 2008. Cancer stem cells: a step toward the cure. *Journal of Clinical Oncology*. 26: 2795-2799.
- Borralho, P. M., Kren, B. T., Castro, R. E., Silva, I. B. M., Steer, C. J. e Rodrigues, C. M. P. 2009. *MicroRNA-143* reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *The FEBS Journal*. 276: 6689-6700.
- Boujrad, H., Gubkina, O., Robert, N., Krantic, S. e Susin, S. A. 2007. AIF-Mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle*. 6: 2612-2619.
- Boyle, P. e Levin, B. 2008. World Cancer Report 2008. Internacional Agency for Research on Cancer. World Health Organisation. Lyon. França. 1-260.
- Bukau, B. e Horwich, A. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92: 351-366.
- Burnie, J. P., Carter, T. L., Hodgetts, S. e Matthews, R. C. 2005. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev*. 30: 53-88.

- Camp, E. R., Summy, J., Bauer, T. W., Liu, W., Gallick, G. E. e Ellis, L. M. 2005. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clinical Cancer Research*. 11: 397-405.
- Cardoso, F. L., Brites, D., Brito, M. A. 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews*. 64: 328-363.
- Compagno, C., Brambilla, L., Capitanio, D., Boschi, F., Ranzi, B. M., e Porro, D. 2001. Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast*. 18: 663-670.
- Croce, C. M. 2008. Molecular origins of cancer: Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine*. 358: 502-511.
- Dolci, A., Dominici, R., Cardinale, D., Sandri, M. T. e Panteghini, M. 2008. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Am. J. Clin. Pathol*. 130: 688-695.
- Doroshov, J. H., Synold, T. W., Somlo, G., Akman, S. A., e Gajewski E. 2001. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. *Blood*. 97: 2839-2845.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B. e Herman J. G. 2000a. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine*. 343: 1350-1354.
- Esteller, M., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Watkins, N. D., Issa, J.-P. J., Sidransky, D., Baylin, S. B. e Herman, J. G. 2000b. Inactivation of the DNA repair gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by promotor hypermethylation is associated with G to A Mutations in *K-RAS* in colorectal tumorigenesis. *Cancer Research*. 60: 2368-2371.
- Fernandes, M. A. 1999. A H⁺ ATPase de membrana plasmática e a resposta ao stress oxidativo, em particular ao stress pelo cobre, em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutoramento. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. 1998. Microbiologia – Volume 1. Lidel – edições técnicas, lda, Lousã, Portugal.
- Figeys, D. 2005. Proteomics: the basic overview *In* Industrial Proteomics: Applications for Biotechnology and Pharmaceuticals (D. Figeys eds), pp 1-62, John Wiley & Sons, Inc..
- Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. e Norris, M. D. 2010. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*. 1-10.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Suécia
- GE Healthcare. 2009. 2-D Clean-Up Kit. EUA

- Gerbasi, V. R., Weaver, C. M., Hill, S., Friedman, D. B. e Link, A. J. 2004. Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 24: 8276-8287.
- Gerber, D. E., 2008. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician*. 77: 311-319.
- Gérolami, R., Uch, R., Bréchet, C., Mannoni, P. e Bagnis, C., 2003. Gene therapy of hepatocarcinoma: a long way from the concept to the therapeutical impact. *Cancer Gene Therapy*. 10: 649-660.
- Goyal, K., e Mande, S. C. 2008. Exploiting 3D structural templates for detection of metal-binding sites in protein structures. *Proteins*. 70: 1206-1218.
- Grady, W. M. e Carethers, J. M. 2008. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 135: 1079-1099.
- Graves, P. R., Haystead, T. A. J. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 39-63.
- Green, P. S. e Leeuwenburgh, C. 2002. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1588: 94-101.
- Hammer, E., Bien, S., Salazar, M. G., Steil, L., Scharf, C., Hildebrandt, P., Schroeder, H. W. S., Kroemer, H. K., Völker, U. e Ritter, C. A., 2009. Proteomic analysis of doxorubicin-induced changes in the proteome of HepG2 cells combining 2-D DIGE and LC-MS/MS approaches. *Proteomics*. 10: 99-114.
- Hanahan, D. e Wienberg, R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144. 646-674.
- Hedges, S. B. 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nature Publishing Group*. 3: 838-849.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. e Cabisco, E. 2007. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica*. 1780: 1217-1235.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 52: 536-553
- Hong, W. K., Bast, R. C., Hait, W. N., Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum R. R., Holland, J. F. e Frei III, E. 2010. *Cancer Medicine*. People's Medical Publishnig House.USA.
- Hong, Y., Müller, U. R., Lai, F. 2003. Discriminating two classes of toxicants through expression analysis of HepG2 cells with DNA arrays. *Toxicology in Vitro*. 17: 85-92.
- Honoré, B., Østergaard, M. e Vorum, H. 2004. Functional genomics studied by proteomics. *BioEssays*. 26: 901-915.

- Huang, C.-C., Chen, P.-C., Huang, C.-W. e Yu, J. 2007. Aristolochic acid induces heart failure in zebrafish embryos that is mediated by inflammation. *Toxicological Sciences*. 100: 486–494.
- Hussain, S. M., Zondervan, P. E., Ifzermans, F. N. M., Schalm, S. W., Man, R. A. e Krestin, G. P. 2002. Benign versus malignant hepatic nodules: MR imaging findings with pathologic. *RadioGraphics*. 22: 1023-1039.
- Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. 2010. *Prontuário terapêutico*. Ministério da Saúde. 20-690.
- Invitrogen. 2005. *Hoechst Stains. Molecular Probes* Invitrogen Detection Technologies. EUA.
- Jacques, S. L., Ejim, L. J. e Wright, G. D. 2001. Homoserine dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic mechanism and stereochemistry of hydride transfer. *Biochimica et Biophysica*. 1544: 42-54.
- Jaganathan, S. K., Mazumdar, A., Mondhe, D. e Mandal, M. 2010. Eugenol promotes apoptosis in colon cancer. *Cell Biology International*. 1-20.
- Josic, D. e Kovac, S. 2008. Application of proteomics in biotechnology – Microbial proteomics. *Biotechnology Journal*. 3: 496-509.
- Jurcut, R., Wildiers, H., Ganame, J., D’hooge, J., Paridaens, R. e Voigt, J.-U. 2008. Detection and monitoring of cardiotoxicity—what does modern cardiology offer? *Support Care Cancer*. 16:437–445.
- Kiechle, F. L., Zhang, X. 2002. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica*. 326: 27-45.
- Klug, W. S. e Cummings, M. R. 2002. *Essentials of genetics*. Prentice Hall, 4ªed., New Jersey.
- Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Yamada, S., Okabe, M., Kishimoto, T. e Yamauchi-Takahara, K. 1999. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *PNAS*. 97: 315-319.
- Langdon, S. P. 2003. *Cancer cell culture – Methods and protocols*. Humana Press.
- Li, L., Pan, Q., Han, W., Liu, Z., Li, L. e Hu, X. 2007. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling. *Clin. Cancer*. 13: 6753-6760.
- Lim, S.-C., Choi, J. E., Kang, H. S. e SI, H. 2010. Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53 - caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*. 126: 1582-1595.
- Lima, L. e Mota, M. 2003. *Biotechnologia - Fundamentos e aplicações*. Lidel – edições técnicas, lda, Lousã, Portugal.

- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D. D., Miyake, K., Resau, J. H. e Bates, S. E. 2000. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *Journal of Cell Science*. 113: 2011-2021.
- Longley, D. B. e Johnston, P. G. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology*. 205: 275-292.
- Lopes, A. M. e Fonseca, A. 1996. *Biologia microbiana*. Universidade Aberta, Lisboa, Portugal
- Luqmani, Y. A. 2005. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice* 14: 35–48.
- Madigan, M. T. e Martinko, J. M. 2006. *Biology of microorganisms*. Pearson – Prentice Hall, 11ªed. USA.
- Marzano, C., Pellei, M., Colavito, S., Alidori, S., Lobbia, G. G., Gandin, V., Tisato, F. e Santini, C. 2006. Synthesis, characterization, and in vitro antitumor properties of tris(hydromethyl)phosphine copper(I) complexes containing the new Bis(1,2,4-triazol-1-yl)acetate ligand. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 7317-7324.
- Mathieu, R. adaptado de Campbell, N. A. e Reece, J. B. 2004. *Biologie*. De Boeck Université, 4ªed. Canada.
- Mell, J. C. e Burgess, S. M. 2002. Yeast as a model genetic organism. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-8.
- Mellor, H. R. e Callaghan, R. 2011. Accumulation and distribution of doxorubicin in tumor spheroids: the influence of acidity and expression of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1-12.
- Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W. e Thompson, C. B. 2008. *The molecular basis of cancer*. Elsevier Science. 3ª ed. Asia.
- Nesatyy, V. J. e Suter, M. J.-F., 2008. Analysis of environmental stress response on the proteome level. 1-27
- Nishikawa, M. 2008. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer letters*. 266: 53-59
- Panini, G. 2007. New metal complexes supported by scorpionate and macrocyclic ligands: chemistry and biological studies. Tese de Doutorado. Universidade de Camerino. Italia.
- Patterson, S. D. e Aebersold, R. H. 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics* suplemente. 33: 311-323.
- Pellei, M., Lobbia, G. G., Santini, C., Spagna, R., Camalli, M., Fedeli, D. e Falconi, G. 2004. Synthesis, characterization and antioxidant and water soluble phosphane ligands. *The Royal Society of Chemistry*. 2822-2828.

- Pellei, M., Panini, G., Lobbia, G. G. e Santini, C. 2009. Chemistry and relevant biomimetic applications of group 6 metals systems supported by Scorpionate. *Current Bioactive Compounds*. 5: 321-352.
- Pettinari, C. 2008. Scorpionates II: chelating borate ligands. Imperial College Press. Italia.
- Pham, T. K. e Wright, P. C. 2007. Proteomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Expert Rev. Proteomics*. 4: 793-813.
- Prescott, L. M., Klein, D. A., Harley, J. P. 2005. Microbiology. McGraw-Hill Higher Education, 6ª ed. U.K.
- Promega. 2009. Technical bulletin: Celltiter 96[®] Aqueous non-radioactive cell proliferation assay. EUA.
- Ptashne, M e Gann, A. 2002. Genes & Signals. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque.
- Rajewsky, M. F. e Müller, R., 2002. DNA repair and the cell cycle as targets in cancer therapy. *The Cancer Handbook* 1ª ed. 1-12
- Rédei, G. P. 2008. Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics. Springer. 3ªed. USA.
- Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S. e Wiedmann, B. 1999. Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast*. 15: 397-407.
- Roy, S. 2008. Synergy of intercalation and coordination binding to design novel DNA-targeting antineoplastic metallodrugs. Tese de Doutorado. Leiden University. Holanda.
- Salvatorelli, E., Menna, P., Lusini, M., Covino, E. e Minotti, G. 2009. Doxorubicinolone formation and efflux: a salvage pathway against epirubicin accumulation in human heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 329: 175-184.
- Schenk, P. W., Brok, M., Boersma, A. W.M., Brandsma, J. A., Dulk, H. D., Burger, H., Stoter, G., Brouwer, J. e Nooter, K. 2003. Anticancer drug resistance induced by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* *NPR2* gene: a novel component involved in Cisplatin- and Doxorubicin-provoked cell kill. *Molecular Pharmacology*. 64: 259-268.
- Schumacker, P. T. 2006. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 175-176.
- Seydel, J. K. e Wiese, M. 2002. Drug-Membrane Interactions: analysis, drug distribution, modelling. Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.
- Sigma. 2011. Trypan blue solution. Sigma-Aldrich. EUA.
- Silva, T. F. S., Mishra, G. S., Silva, M. F. G., Wanke, R., Martins, L. M. D. R. S., e Pombeiro, A. J. L. 2009. Cu^{II} complexes bearing the 2,2,2-tris(1-pyrazolyl)ethanol or 2,2,2-tris(1-pyrazolyl)ethyl

- methanesulfonate scorpionates. X-Ray structural characterization and application in the mild catalytic peroxidative oxidation of cyclohexane. The Royal Society of Chemistry. 9207-9215.
- Sousa, R. I. 2010. Cuidados farmacêuticos no doente oncológico. Monografia. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde.
- Storz, P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*. 10: 1881-1896.
- Strober, W. 1997. Trypan blue exclusion test of cell viability *in* Current protocols in immunology (W. Strober), pp 4299 – 4300, John Wiley & Sons, Inc. Nova Iorque.
- Teixeira, A. J. C. e Casquinha, P. adaptado de Kindersley, D. 1992. Combater o cancro. Livraria Civilização Editora, Portugal.
- Teixeira, M. C., Santos, P. M., Fernandes, A. R. e Sá-Correia, I. 2005. A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2, 4-diclorophenoxyacetic acid. *Proteomics*. 5: 1889-1901.
- Teixeira, M. C., Santos, P. M., Rodrigues, C. e Sá-Correia, I. 2009. Teaching expression proteomics: from the wet-lab to the laptop. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 37: 279-286.
- Twyman, R. M. 2004. Principles of Proteomics. 1ª ed. Taylor & Francis, Inc.. EUA.
- Wang, J., Chan, J. Y.-W., Fong, C.-C., Tzang, C.-H., Fung, K.-P., Yang, M. 2009. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cytotoxicity and resistance in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Liver International*. 1338-1347
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S. e Kalyanaraman, B. 2004. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 25535-25543.
- Westmoreland, T. J., Wickramasekara, S. M., Guo, A. Y., Selim, A. L., Winsor, T. S., Greenleaf, A. L., Blackwell, K. L., Olson, J. A., Marks, J. R. e Bennett C. B. 2009. Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*. 4: 1-20.
- Wheeler, G. N. e Brändli, A. W. 2009. Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *xenopus*. *Developmental Dynamics*. 238: 1287-1308.
- White, H. E., Orlava, E. V., Chen, S., Wang, L., Ignatiou, A., Gowen, B., Stromer, T., Franzmann, T. M., Haslbeck, M., Buchner, J. e Saibil, H. R. 2006. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure*. 14: 1197-1204.
- Williams, F. E., Sickelbaugh, T. J. e Hassoun, E. 2006. Modulation by ellagic acid of DCA-induced developmental toxicity in the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Biochem Molecular Toxicology*. 20: 183-190.

Wood, L. D., Parsons, W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., Shen, D., Boca, S. M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabos S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, J. K. V., Sukumar, S., Polyak, K., Park, B. H., Pethiyagoda, C. L., Pant, P. V. K., Ballinger, D. G., Sparks, A. B., Hartigan, J., Smith, D. R., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, S. D., Parmigiani, G., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E. e Vogelstein, B. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 318: 1108-1113.

Yang, J.-F, Cao, J.-G., Tian, L. e Liu, F. 2011. 5, 7-dimethoxyflavone sensitizes TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1-12.

Yokochi, T. e Robertson, K. D. 2004. Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis. *Molecular Pharmacology*. 66: 1415-1420.

Yokota, J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21: 497-503.

Zaboikin, M., Srinivasakumar, N. e Schuening, F. 2006. Gene therapy with drug resistance genes. *Cancer Gene Therapy*. 13: 335-345.

6. Referências eletrônicas

- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2011. In <http://atlasgeneticsoncology.org>.
- Colorectal Cancer Association of Canada. 2008. Colorectal Cancer. Versão 2008. <http://www.colorectal-cancer.ca/en/> in <http://www.colorectal-cancer.ca/en/>.
- Denny, B. e Wansbrough, H. 2008. The design and development of anti-cancer drugs. Versão 2005-2008. <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/12J.pdf> in <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/biotech/>
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. 2004. HCT-116. http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=581&from=cell_line_index&select=H&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0 in <http://www.dsmz.de>
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. 2004. Hep-G2. http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=180&term=hEP&highlight= in <http://www.dsmz.de>
- European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis. 2009. *Saccharomyces cerevisiae* estirpe BY4741 in <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>.
- Genetics Home Reference. Versão Setembro 2011. <http://ghr.nlm.nih.gov>
- HepHelp. 2011. Hepatocellular carcinoma. Versão 2007. in. <http://www.hephelp.net>.
- HUGO Gene Nomenclature Committee. <http://www.genenames.org>.
- Human Pathology. 2011. Colorectal cancer. Versão Setembro 2004. In <http://www.humpath.com>.
- Lebendiker, M. 2002. Protein Precipitation Protocols. <http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/ProteinPrecipitation.html> in The protein purification facility, <http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/ProteinPrecipitation.html>.
- MedlinePlus. 2011. Hepatocellular carcinoma. Versão Agosto 2011. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000280.htm> in <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>
- National Cancer Institute at the National Institute of Health. 2011. Doxorubicin hydrochloride. Versão 26 de Janeiro 2011. <http://www.cancer.gov/drugdictionary>.
- National Cancer Institute at the National Institute of Health. 2011. Types of cancer. Versão 26 de Janeiro 2011. <http://www.cancer.gov>.
- National Center for Biotechnology Information. HCT116 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=HCT116> in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nonlinear Dynamics. 2011. *Progenesis SameSpots*. in http://www.nonlinear.com/productsem/progenesisemsame_spotsemoverview/

Pfizer Oncology, 2010. Fact sheet: Colorectal Cancer (CRC). Versão de 24 de Maio 2010. http://www.pfizer.com/files/news/asco/colorectal_cancer_crc_fact_sheet_2010.pdf in Pfizer <http://www.pfizer.com/home/>.

Rajan, T. V. Hepatocellular carcinoma. in <http://pathweb.uchc.edu>
Saccharomyces Genome Database. 2011. *Saccharomyces cerevisiae*. in <http://www.yeastgenome.org/>.

Schulich School of Medicine & Dentistry. The University of Western Ontario. Biochemistry. TCA/DOC. Versão 2011 in <http://www.biochem.uwo.ca>

The Universal Protein Resource. 2011 in www.uniprot.org.

Toronto Research Chemicals. Doxorubicin Hydrochloride. <http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=D558000> in <http://www.trc-canada.com/>

World Health Organization. 2011. Cancer Fact sheet n°297. Versão Fevereiro 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> in <http://www.who.int/mediacentre>.